

Screening nach neuroprotektiven Substanzen und Pflanzenextrakten – Untersuchung zur Regulation von Apolipoprotein E

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apothekerin Katrin Boywitz, geb. Bauer
geboren am 14. März 1978 in München

Gutachter

1. Prof. Dr. Thomas Winckler
2. Prof. Dr. Jörg Heilmann
3. Prof. Dr. Stefan Wölfl

Tag der öffentlichen Verteidigung: 27.11.2009

Meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	X
--------------------------	----------

Einleitung

1	Die Alzheimer-Demenz.....	1
1.1	Geschichte der Alzheimer Demenz.....	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Formen der Alzheimer-Demenz	2
1.4	Pathogenese der Alzheimer-Demenz	4
1.4.1	Histopathologie	4
1.4.2	APP, Sekretasen und A β	5
1.4.3	Tau-Protein und neurofibrilläre Bündel	8
1.5	Risikofaktoren	9
1.5.1	Genetische Prädisposition	9
1.5.2	Weitere Risikofaktoren	10
1.6	Symptome und Diagnostik	11
1.7	Therapie der Alzheimer-Demenz	13
1.7.1	Behandlung der kognitiven Symptomatik.....	14
1.7.1.1	Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer)	14
1.7.1.2	Selektiver nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin.....	15
1.7.1.3	Nootropika.....	16
1.7.2	Behandlung der nicht-kognitiven Symptomatik	17
1.7.3	Neue Therapieansätze	17
2	Apolipoprotein E.....	18
2.1	Struktur und Funktion	19
2.2	Vorkommende Isoformen des ApoE-Proteins	20
2.3	Proteinstruktur	21
2.4	Rolle des Apolipoprotein E bei der Alzheimer-Demenz	22
2.4.1	ApoE und A β	23
2.4.2	ApoE und neurofibrilläre Bündel	23
2.4.3	ApoE, Cholesterol und synaptische Reparatur.....	24
2.4.4	ApoE und cholinerge Dysfunktion.....	24
2.4.5	ApoE und Neurotoxizität	25
2.4.6	Rolle der ApoE-Proteinexpression im Zusammenhang mit Alzheimer-Demenz	26
2.5	Der <i>APOE</i> -Promotor	27
2.5.1	Promotorpolymorphismen.....	28
2.5.2	Promotorpolymorphismen im Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz.....	29
3	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM.....	31
3.1	Systematik und Botanik	31
3.2	Inhaltsstoffe	32
3.3	Traditionelle Anwendung.....	32
3.4	Wissenschaftliche Datenlage der Wirkungen	33
4	Zielstellung der Arbeit.....	35

Materialien und Methoden

5	Materialien	36
5.1	Laborgeräte.....	36
5.2	Verbrauchsmaterialien	37
5.3	Stationäre Phasen	38
5.4	Lösungsmittel und Gase	38
5.5	Chemikalien und Reagenzien.....	39
5.6	Kits	40
5.7	Primer.....	41
5.7.1	Primer für Real-Time PCR.....	41
5.7.2	Primer für die Klonierung der <i>APOE</i> -Promotorregion	42
5.7.3	Primer für Doppelstrangmutagenesen und Sequenzierungen	42
5.7.4	Primer zur Sequenzanalyse der ITS-Region	43
5.8	Vektoren	43
5.8.1	Kommerzielle Ausgangsvektoren	43
5.8.2	Hergestellte Vektorkonstrukte mit Insert	44
5.9	Enzyme.....	44
5.10	Puffer und Lösungsmittelgemische.....	45
5.11	Nährmedien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	45
5.12	Medien für die humane Zellkultur	46
5.13	Stämme von <i>E.coli</i>	46
5.14	Zelllinien	46
5.15	Drogenmaterial.....	47
5.16	Getestete Substanzen und Extrakte	48
6	Zellkultur	50
6.1	Humane Astrozytomzelllinie 1321N1.....	50
6.2	Stabil transfizierte 1321N1-Zellen	51
6.3	Humane Glioblastomzelllinie U87-MG	52
6.4	Stabil transfizierte U87-MG-Zellen	52
7	Genetische Polymorphismen im <i>APOE</i>-Gen der Astrozytomzelllinie 1321N1	52
7.1	Kodierende Region des <i>APOE</i> -Gens.....	52
7.1.1	Sequenzierung eines PCR-Produkts.....	52
7.1.2	<i>Real-Time</i> -PCR	53
7.2	Polymorphismen in der <i>APOE</i> -Promotorregion: Sequenzierung eines PCR-Produkts.....	55
8	Charakterisierung der <i>APOE</i>-Promotorregion: Molekularbiologische Methoden zur Klonierung der Plasmide.....	55
8.1	Molekularbiologische Standardmethoden.....	55
8.2	Doppelstrangmutagenesen	56
9	Reporter-gen-Assay zur Identifizierung <i>APOE</i>-modulierender Verbindungen	58
9.1	Molekularbiologische Methoden in humanen Zellen.....	58
9.1.1	Transfektion	58
9.1.2	Selektion mit Hygromycin-B	59

9.1.3	Isolierung von Klonen	59
9.1.4	Präparation von genomischer DNA	60
9.1.5	Isolierung von Total-RNA	60
9.2	Luciferase-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten Zellen	61
9.2.1	Testprinzip.....	62
9.2.2	Durchführung	62
9.2.3	MTT-Assay	64
10	<i>Real-Time</i>-RT-PCR zur Verifizierung der <i>APOE</i>-Regulation	65
10.1	Testprinzip.....	65
10.2	Zellstimulation	66
10.3	Durchführung der <i>Real-Time</i> -RT-PCR	67
10.4	Validierung der optimalen Primerkonzentration.....	68
10.5	Experimentelle Ermittlung der Effizienzen von <i>APOE</i> und <i>GAPDH</i>	68
10.6	Validierung des Testsystems mittels Dibutryl-cAMP.....	69
11	Verifizierung der Aktivität der Extraktfraktionen aus <i>T. pandacaqui</i> in einem modifizierten Reportergen-Assay.....	69
11.1	Luciferase-Reportergen-Assay mit transient transfizierten Zellen	69
11.2	Durchführung	71
12	Molekulargenetische Identitätsprüfung – Sequenzanalyse der ITS-Region von <i>T. pandacaqui</i>	72
12.1	Isolierung genomischer DNA aus getrocknetem Pflanzenmaterial	73
12.2	Amplifizierung und Sequenzierung der ITS-Region.	73
13	Phytochemische Methoden	74
13.1	Gewinnung von Extrakten aus TCM-Drogen	74
13.2	Gewinnung von Extrakten aus <i>T. pandacaqui</i> mittels beschleunigter Lösungsmittelextraktion (ASE).....	75
13.3	Isolierung der Alkaloidfraktion aus <i>T. pandacaqui</i>	75
13.4	Chromatographische Methoden	76
13.4.1	Dünnschichtchromatographie.....	76
13.4.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	77
13.4.3	Säulenchromatographie	78
13.4.3.1	Adsorptionschromatographie	78
13.4.3.2	Gelfiltrationschromatographie	79

Ergebnisse

14	Genetische Polymorphismen im <i>APOE</i>-Gen der Astrozytomzelllinie 1321N1	80
14.1	Kodierende Region des <i>APOE</i> -Gens.....	81
14.1.1	Sequenzierung	81
14.1.2	<i>Real-Time</i> -PCR	83
14.2	Polymorphismen in der <i>APOE</i> -Promotorregion	85

15	Charakterisierung der <i>APOE</i>-Promotorregion	86
15.1	5'-regulatorische Region des <i>APOE</i> -Promotors der Astrozytomzelllinie 1321N1	87
15.2	<i>APOE</i> -Promotorregion einer humanen Blutprobe.....	87
15.3	Promotormutanten	88
16	Reporter-gen-Assay zur Identifizierung <i>APOE</i>-modulierender Verbindungen	89
16.1	Etablierung stabiler Reporter-gen-Zelllinien in der Astrozytomzelllinie 1321N1	90
16.1.1	Bestimmung der effektiven Konzentration zur Selektion mit Hygromycin-B ...	90
16.1.2	Stabil transfizierte Zelllinien (1321N1)	90
16.1.3	Zelllinien MK 25040 und MKz 25040.....	91
16.2	Validierung mit Dibutyryl-cAMP: Einfluss der klonierten Promotorregion	93
16.3	Regulation der <i>APOE</i> -Expression	95
16.4	Einfluss der Zelllinie: stabile Transfektion der Glioblastomzelllinie U87-MG..	97
16.4.1	Bestimmung der effektiven Konzentration zur Selektion mit Hygromycin-B ...	98
16.4.2	Stabil transfizierte Zelllinien (U87-MG).....	98
16.4.3	Validierung mit Dibutyryl-cAMP (U87-MG-Zellen)	99
17	<i>Real-Time</i>-RT-PCR zur Verifizierung der <i>APOE</i>-Regulation	100
17.1	Bestimmung der Effizienzen der Amplifizierung von <i>APOE</i> und <i>GAPDH</i>	101
17.2	Validierung der <i>Real-Time</i> -RT-PCR-Methode mit Dibutyryl-cAMP	102
18	Screening nach <i>APOE</i>-modulierenden Substanzen und Extrakten.....	103
18.1	Reinsubstanzen.....	104
18.1.1	Screening der Reinsubstanzen im Luciferase-Reporter-gen-Assay	104
18.1.2	<i>Real-Time</i> -RT-PCR: Reinsubstanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, LEYS 517 und Atorvastatin	106
18.2	TCM-Extrakte	107
18.2.1	Screening der TCM-Extrakte im Luciferase-Reporter-gen-Assay	108
18.2.2	<i>Real-Time</i> -RT-PCR: TCM 9 M und TCM 9 W (<i>Scutellariae radix</i>)	109
18.3	Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung	110
19	Molekulargenetische Identitätsprüfung – Sequenzanalyse der ITS-Region von <i>T. pandacaqui</i>.....	112
20	Aktive Verbindungen aus <i>T. pandacaqui</i>.....	114
20.1	Extraktgewinnung mittels beschleunigter Lösungsmittel-extraktion (ASE).....	115
20.2	Isolierung der Alkaloidfraktion aus <i>T. pandacaqui</i> und Testung auf <i>APOE</i> -modulierende Aktivitäten	116
20.3	Aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des methanolischen Extrakts A 3	118
20.3.1	Scheidetrichter (Fraktion A 3).....	120
20.3.2	Kieselgelvakuumsäule (Fraktion B 1).....	120
20.3.3	Offene Kieselgelsäule (Fraktion C 6).....	121
20.3.4	Gelfiltrationschromatographie (Fraktion D 5)	122
20.3.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Fraktionen E 3 und G 6)	122
20.4	<i>Real-Time</i> -RT-PCR: aktive <i>T. pandacaqui</i> -Fraktionen	124
21	Untersuchungen von aktiven Fraktionen aus <i>T. pandacaqui</i> in einem modifizierten Reporter-gen-Assay	126

Diskussion

22	Etablierung eines Reporter-gen-Assays zur Identifizierung <i>APOE</i>-modulierender Verbindungen	129
22.1	Etablierung und Validierung eines Reporter-gen-Assays	129
22.2	Untersuchung der inversen Regulation des Reporter-gens.....	131
22.3	Modifizierter Reporter-gen-Assay	134
23	Screening zur Identifizierung <i>APOE</i>-modulierender Verbindungen	136
24	Aktive Verbindungen aus <i>T. pandacaqui</i>.....	138
24.1	Testung der Alkaloid-Fraktion auf <i>APOE</i> -mRNA-modulierende Aktivitäten ...	138
24.2	Aktive Fraktionen.....	139
25	Ausblick: <i>APOE</i> als therapeutischer Angriffspunkt.....	139

Zusammenfassung	142
------------------------------	------------

Summary.....	144
---------------------	------------

Literaturverzeichnis.....	146
----------------------------------	------------

Anhang	151
Abbildungsverzeichnis	161
Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge	163
Danksagung	164
Lebenslauf	166
Ehrenwörtliche Erklärung	167

Abkürzungen

A	Absorption
A β	Amyloid β
AChE	Acetylcholinesterase
AD	<i>Alzheimer's disease</i> – Alzheimersche Krankheit, Alzheimer-Demenz
AP-2	<i>Activating protein 2</i> – aktivierendes Protein 2
APH 1	<i>Anterior pharynx-defective 1</i>
ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>amyloid beta (A4) precursor protein</i> – Amyloid-Vorläuferprotein
ASE	<i>Accelerated solvent extractor</i> – Apparatur zur beschleunigten Lösungsmittlextraktion
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BEF-1	<i>BK virus enhancer factor 1</i>
bp	Basenpaare
CA	<i>Crude alkaloidal fraction</i> – Alkaloidfraktion (unbearbeitet)
cdk5	Cyclin-abhängige Proteinkinase 5
cDNA	<i>Copy-DNA</i>
CT	Computer-Tomographie
Da	Dalton
Dibutryl-	
cAMP	zyklisches N ⁶ , O2'-Dibutryladenosin-3',5'-Monophosphat, Natriumsalz
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRE	<i>Downstream regulatory element</i>
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
E	Effizienz
EEG	Elektroenzephalographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EtOH	Ethanol
EtOAc	Ethylacetat

FC	<i>fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> – fötales Kälberserum
FTDP-17	Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosom 17
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GSK-3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
HDL	<i>High-density-lipoprotein</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICD	<i>International Classification of Diseases</i> – Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IQWiG	Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LDL	<i>Low-density-lipoprotein</i>
low TE	Low-Tris-EDTA
LRP	<i>receptor related protein</i>
MeOH	Methanol
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
(m/v)	Masse/Volumen
MK	Mischkultur verschiedener Klone bei der Etablierung stabil transfizierter Zellen
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (Thiazolylblau)
NFT	Neurofibrillären Bündel
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> – Kernresonanzspektroskopie
N.S.E.	<i>Non-specific enhancer element</i>
NTC	<i>No template control</i> – Negativkontrolle ohne DNA
No-RT	Kontrolle ohne reverse Transkription
P/S	Penicillin/Streptomycin
p. a.	<i>Pro analysi</i> – für die Analyse

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Polymerase-Kettenreaktion
PET	<i>Positive element for transcription</i>
PHF	<i>Paired helical filaments</i> – gepaarte helikale Filamente
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PSEN 1	Präsenilin 1
PSEN 2	Präsenilin 2
RIP	<i>Regulated intramembrane proteolysis</i> – regulierte intramembranäre Spaltung
RLU	<i>Relative light units</i> – relative Lichteinheiten
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> – Natriumdodecylsulfat
SF	<i>Straight filaments</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SPAP	<i>Secreted placental alkaline phosphatase</i>
SSRI	<i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitor</i> – selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TMD	Transmembranäre Domäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Trometamol)
URE	<i>Upstream regulatory element</i>
VD	Vaskuläre Demenz
VLDL	<i>Very-low-density-lipoprotein</i>
ZNS	Zentralnervensystem

Kürzel von Transkripten sowie von Genen sind in der Dissertation kursiv dargestellt, Kürzel von Proteinen hingegen nicht.

Einleitung

1 Die Alzheimer-Demenz

1.1 Geschichte der Alzheimer-Demenz

Das Krankheitsbild der Alzheimer-Demenz (AD) wurde erstmals 1906 durch den deutschen Arzt Alois Alzheimer (* 1864 in Marktbreit, † 1915 in Breslau) beschrieben. In den Jahren

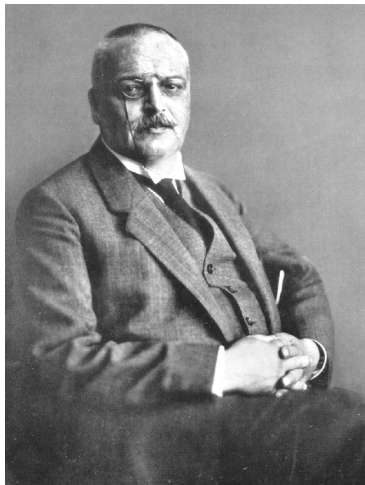


Abbildung 1: Alois Alzheimer.

zuvor war er in der „Städtischen Anstalt für Irre und Epileptische“ in Frankfurt am Main tätig. Dort erweckte 1901 die Patientin Auguste Deter sein Interesse, da sie bei ihrer Einlieferung an seniler Demenz zu leiden schien, jedoch mit 51 Jahren weitaus jünger war als vorherige Patienten. Alois Alzheimer vermutete aufgrund der klinischen Symptomatik und des Alters eine neue und „eigenartige“ Erkrankung und behielt die Patientin auch nach seinem Wechsel an die Hohe Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München im Gedächtnis. Als er 1906 über den Tod der Auguste

Deter informiert wurde, bat er um Erlaubnis, das Gehirn mikroskopisch untersuchen zu dürfen. Dabei fielen ihm neben einer Atrophie der Hirnrinde zwei histopathologische Charakteristika auf, die heute noch zur postmortalen Diagnose der Alzheimer-Krankheit angewandt werden. Zum einen beobachtete Alzheimer eine Fibrillenbildung innerhalb der Nervenzellen, von der heute bekannt ist, dass hyperphosphoryliertes Tau-Protein der Hauptbestandteil der intrazellulären neurofibrillären Bündel ist. Zum anderen konnte er Ablagerungen in Form von Plaques in der gesamten Hirnrinde erkennen, von denen man heute weiß, dass diese hauptsächlich aus dem β -Amyloid-Peptid bestehen.

Auf der „37. Versammlung der Süddeutschen Irrenärzte“ in Tübingen präsentierte Alois Alzheimer 1906 seine gewonnenen Erkenntnisse und musste feststellen, dass diese auf kein Interesse stießen. Doch trotz der damals niedrigen Prävalenz wuchs das Interesse an der präsenilen Demenz schon innerhalb weniger Jahre. Die Bezeichnung Alzheimer-Krankheit wurde erstmals 1910 in Kraepelins Lehrbuch der Psychiatrie erwähnt (Eckert, 2002). Da sich die Lebenserwartung in den Industrieländern erhöht hat, sind heute weitaus mehr Menschen

von der Alzheimer-Demenz betroffen und somit hat sich auch das Interesse für diese Krankheit gewandelt.

1.2 Epidemiologie

In Deutschland leben derzeit etwa 1,1 Millionen Demenzkranke, von denen knapp zwei Drittel an der Alzheimer-Krankheit leiden. Nach Vorausberechnungen der Bevölkerungsentwicklung wird sich die Anzahl der Demenzkranken bis zum Jahr 2050 auf etwa 2,6 Millionen erhöhen, sofern kein Durchbruch in Prävention und Therapie gelingt (Bickel, 2008). Meta-Analysen zeigen, dass die Prävalenz der Alzheimer-Demenz mit zunehmendem Alter ansteigt. So sind im Alter zwischen 65 und 69 Jahren 0,7 % der Männer und 1,0 % der Frauen betroffen, wohingegen im Alter zwischen 90 und 94 Jahren schon 23,7 % der Männer und 31,0 % der Frauen erkrankt sind. Die Zahl aller Neuerkrankungen liegt bei ca. 1 % der über 65-Jährigen pro Jahr (Weyerer, 2005).

Im Zuge des demographischen Wandels ist mit einer Erhöhung der Kosten für Therapie und Pflege der Demenzpatienten zu rechnen. Hallauer *et al.* (2000) ermittelten 43.767 Euro Gesamtkosten pro Patient und Jahr, von denen 67,9 % auf die Familie des Erkrankten entfallen. Die jährlichen Kosten sind abhängig vom Schweregrad der Erkrankung. Im frühen Krankheitsstadium betragen diese pro Patient 5.100 Euro und steigen im fortgeschrittenen Stadium auf 92.000 Euro an. Auch aufgrund der steigenden finanziellen und sozialen Belastung ist es somit notwendig, sowohl eine bestmögliche Behandlung bereitzustellen als auch die Entwicklung neuer medikamentöser Therapien voranzutreiben.

1.3 Formen der Alzheimer-Demenz

Die Alzheimer-Demenz ist in den Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems einzuordnen. Unter Demenz versteht man nach Definition der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10-GM, Version 2009, Internetquelle 6) ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassungsvermögen, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen. Das Bewusstsein ist bei einer Demenz nicht getrübt und die kognitiven Beeinträchtigungen werden gewöhnlich von

Veränderungen der emotionalen Kontrolle, des Sozialverhaltens oder der Motivation begleitet.

Prinzipiell kann man zwischen primären und sekundären Demenz-Formen unterscheiden. Bei primären Demenzen beginnt der Krankheitsprozess direkt im Gehirn und ist nach heutigem Kenntnisstand irreversibel. Zu den primären Demenzen zählen die Alzheimer-Demenz, vaskuläre Demenzen (VD), die Lewy-Körperchen-Demenz und die frontotemporale Demenz (Internetquelle 7). Sekundäre Demenzen sind die Folge einer organischen Erkrankung wie Hirntrauma, Hirntumore, Infektionen oder auch der Einnahme toxischer Substanzen (z.B. Alkohol).

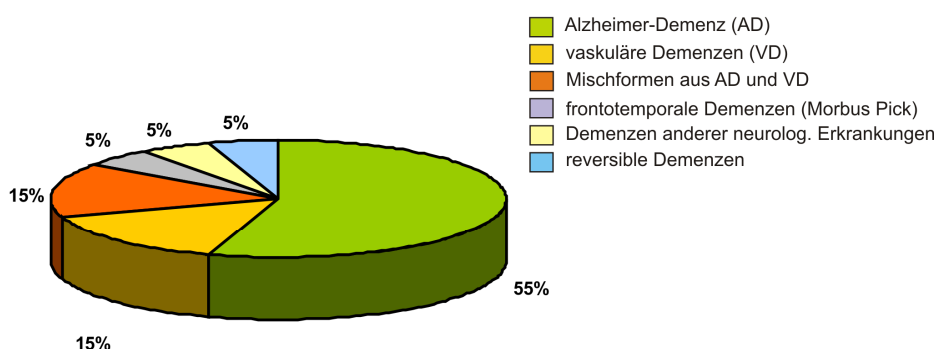


Abbildung 2:

Prozentuale Häufigkeit verschiedener Demenzursachen (modifiziert nach Internetquelle 8).

Mit 55 % aller Demenzfälle ist die Alzheimer-Demenz die am häufigsten auftretende Form der primären Demenzen (Abbildung 2). Vaskuläre Demenzen und Mischformen aus AD und VD betreffen jeweils etwa 15 % der Erkrankten und sind somit die zweithäufigste Gruppe. Etwa 90 % aller Alzheimer-Fälle können der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz zugeschrieben werden. In der Regel tritt die Krankheit ohne familiäre Häufung und erst bei hohem Alter in Erscheinung. Die meisten Patienten sind zum Zeitpunkt der Erkrankung älter als 65 Jahre. Deshalb wird diese Form auch als Alzheimer-Demenz mit spätem Krankheitsbeginn (*late-onset AD*) bezeichnet. Nur ein geringer Anteil der Alzheimer-Patienten leidet unter der familiären Form, der Alzheimer-Demenz mit frühem Krankheitsbeginn (*early-onset AD*). Hier entwickelt sich die Alzheimer-Symptomatik schon vor dem 65., in der Regel sogar schon zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr (Weyerer, 2005). Unabhängig vom Alter des Patienten bei Krankheitsbeginn und der Form der Alzheimer-Demenz zeigen sich bei allen Patienten identische pathologische Veränderungen im Gehirn. Unterschiede gibt es jedoch im Krankheitsverlauf. Jüngere Patienten zeigen ein schnelleres Voranschreiten der Krankheitssymptome und ein stärker ausgeprägtes pathologisches Bild des Gehirns (Brouwers *et al.*, 2008).

1.4 Pathogenese der Alzheimer-Demenz

1.4.1 Histopathologie

Die histopathologischen Hauptmerkmale sind neben einem massiven Verlust von Neuronen im Hippocampus und inferioren Temporallappen die Anhäufung der senilen Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündel in Cortex, Hippocampus, Amygdala und anderen Bereichen, die für die Gedächtnisfunktion relevant sind. Ebenso finden sich Amyloid-Ablagerungen auch in cerebralen Blutgefäßen wieder (Hock und Nitsch, 2000).

In Folge des Verlusts von Neuronen kommt es im Laufe der Krankheit zu einer Schrumpfung des Gehirns um 20 % und damit verbunden zu einer Vertiefung der Windungsfurchen an der Hirnoberfläche sowie einer Erweiterung der Hirnkammern. Mit Hilfe bildgebender Verfahren wie Computer-Tomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) kann dieser Prozess im mittleren und fortgeschrittenen Stadium der Krankheit sichtbar gemacht werden (Arendt, 1999).

Wie bereits erwähnt, erkannte schon Alois Alzheimer bei der mikroskopischen Untersuchung des Gehirns der Auguste Deter die zentralen histopathologischen Läsionen der AD: die senilen Plaques und die neurofibrillären Bündel. Diese sind in Abbildung 3, welche den cerebralen Cortex eines Alzheimer-Patienten darstellt, deutlich zu erkennen.

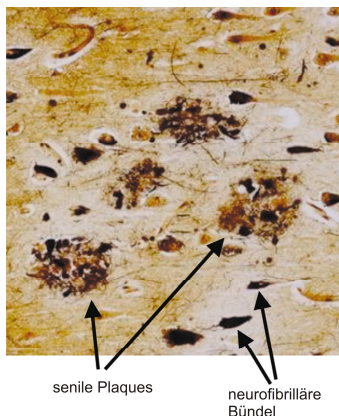


Abbildung 3:
Senile Plaques und neurofibrilläre Bündel im cerebralen Cortex

Hauptbestandteil der extrazellulären senilen Plaques ist das β -Amyloid-(A β)-Peptid, wohingegen die intrazellulären neurofibrillären Bündel aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen (modifiziert nach Blennow *et al.*, 2006).

Bei den senilen Plaques handelt es sich um Proteinablagerungen mit einem Durchmesser in der Größenordnung von 10 - 150 μ m, deren Hauptkomponente das β -Amyloid-(A β)-Peptid ist. Dieses besteht aus 39-42 Aminosäuren und liegt in einer β -Faltblattstruktur vor. Näslund *et al.* (2000) zeigten, dass A β -Ablagerungen der klinischen Symptomatik zum Teil sogar vorausgehen und dass deren Zunahme mit der Konversion vom präsymptomatischen zum symptomatischen Stadium verbunden ist. Die neurofibrillären Bündel sind das zweite wesentliche Merkmal der Alzheimer-Pathologie. Ihr Hauptbestandteil ist das

hyperphosphorylierte Tau-Protein, welches intrazellulär akkumuliert und primär zu gepaarten helikalen Filamenten aggregiert.

1.4.2 APP, Sekretasen und A β

Das β -Amyloid-Protein ist Hauptbestandteil der senilen Plaques der Alzheimer-Demenz. Es besteht aus 39-42 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 4 kDa. *In vivo* kommen hauptsächlich die Varianten A β_{40} und A β_{42} vor, welche sich hinsichtlich ihrer physiko-chemischen Eigenschaften unterscheiden. So ist A β_{42} durch die C-terminalen Aminosäuren Alanin und Isoleucin weitaus hydrophober als A β_{40} , was dazu führt, dass es leichter und schneller aggregiert. Ebenso tendiert es im Vergleich zu A β_{40} dazu Trimere und Tetramere zu formen. Aufgrund dieser Eigenschaften ist A β_{42} als Hauptbestandteil der senilen Plaques anzutreffen (Haass und Selkoe, 2007). Die β -Amyloid-Proteine sind Spaltprodukte des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein* – APP). Dieses ist ein ubiquitär exprimiertes glykosyliertes Transmembranprotein. Es wird in einer Vielzahl von Geweben gebildet und liegt in verschiedenen Isoformen vor. Die Prozessierung des APP ist ein normaler Vorgang, der in fast allen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen geschieht. Dieser Mechanismus wird als regulierte intramembranäre Spaltung (*regulated intramembrane proteolysis*, RIP) bezeichnet. Dabei wird in einem ersten Schritt die Ektodomäne eines Membranproteins gespalten und die luminaire Domäne in die extrazelluläre Matrix abgegeben. Die verbleibende transmembranäre Domäne (TMD) kann erneut gespalten werden. Dabei entstehen sowohl intrazelluläre Domänen die ins Cytosol wandern als auch kleine hydrophobe Peptide, die extrazellulär verbleiben (Haass und Selkoe, 2007).

Im Falle des APP sind grundsätzlich zwei verschiedene Wege der Prozessierung möglich: der nicht-amyloidogene und der amyloidogene Weg. Wie in Abbildung 4 dargestellt, wird das lösliche APP im nicht-amyloidogenen Weg im ersten Schritt durch die α -Sekretase gespalten, die aus einem oder mehreren Mitgliedern der Familie der ADAM-Metalloproteasen besteht. Dadurch wird das lösliche α -APP in die extrazelluläre Matrix abgegeben. Das verbleibende C-terminale Fragment (C83) wird durch eine γ -Sekretase in das kleine Peptidfragment p3 und die intrazelluläre APP Domäne (APP *intracellular domain*, AICD) gespalten. Auf diesem Weg ist eine A β -Bildung nicht möglich. Das Peptidfragment p3 wird wiederum in die extrazelluläre Matrix abgegeben, während die AICD ins Cytosol wandert.

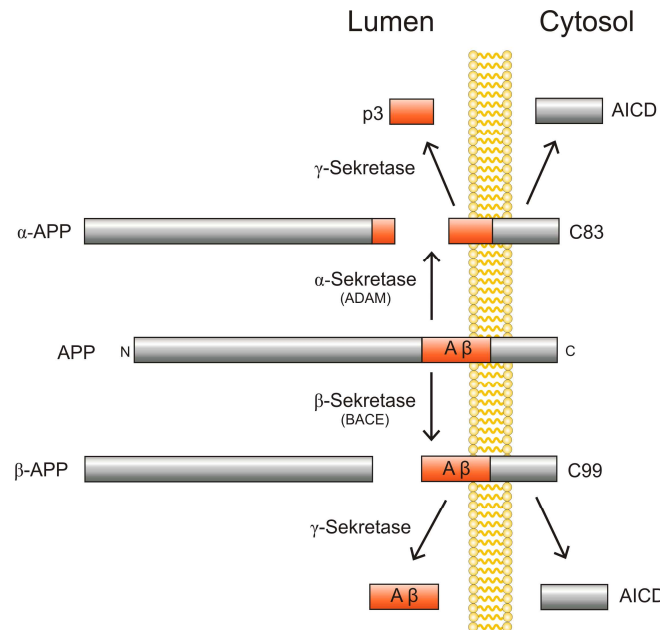


Abbildung 4:

Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP)

APP kann entweder auf dem nicht-amyloidogenen Weg durch die α-Sekretase oder auf dem amyloidogenen Weg durch die β-Sekretase gespalten werden. Beide Sekretasen schneiden an unterschiedlichen Stellen der Ektodomäne des APP. Das Schneiden der α-Sekretase resultiert in C83, welches die Aβ-Bildung ausschließt, da nach der γ-Sekretase-Spaltung das kleine Peptidfragment p3 entsteht. Das konsekutive Schneiden der β- und γ-Sekretase führt zur Bildung von vollständigem Aβ-Peptid. AICD (APP intrazelluläre Domäne) entsteht sowohl im amyloidogenen als auch im nicht-amyloidogenen Weg (modifiziert nach Leschik, 2005).

Im amyloidogenen Weg wird APP mittels einer β-Sekretase (BACE, *β-site APP-cleaving enzyme*) zu dem löslichen β-APP und dem C-terminale Fragment (C99) prozessiert. Analog zum nicht-amyloidogenen Weg verbleibt das β-APP extrazellulär und das C99 wird durch eine γ-Sekretase gespalten, wobei neben der AICD auch das β-Amyloid-Protein entsteht (Newman *et al.*, 2007). Die γ-Sekretase ist ein Komplex bestehend aus Präsenilin 1 oder Präsenilin 2, Nicastrin, APH 1 (*anterior pharynx-defective 1*) und PEN2 (Präsenilin-Verstärker 2, *presenilin enhancer 2*). Der sogenannte γ-Schnitt der Sekretase ist variabel und führt so zu Aβ-Peptiden mit 38, 40 und 42 Aminosäuren, von welchen das Aβ₄₂ die größte Pathogenität aufweist (Haass und Selkoe, 2007). Dieses liegt initial als Monomer vor, welches jedoch zu Intermediaten (Oligomeren und nachfolgend Protofibrillen und Fibrillen) und letztlich zu Amyloid-Plaques aggregiert. Dabei findet eine Konformationsänderung zur β-Faltblattstruktur statt. Eine Neurotoxizität konnte sowohl für die Intermediate, die Fibrillen als auch für die Plaques gezeigt werden, wobei die Intermediate die höchste neurotoxische Potenz aufwiesen (Dahlgren *et al.*, 2002).

Die „β-Amyloid-Hypothese“ besagt, dass eine Änderung in der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins zu vermehrter Bildung des Aβ-Peptids führt. Dies wiederum resultiert in einer vermehrten Akkumulation des Aβ, dem primären Ereignis der Pathogenese

der Alzheimer-Demenz (Blennow *et al.*, 2006). Sukzessive Veränderungen des *Steady-State*-Levels des β -Amyloid-Proteins können die Amyloid-Kaskade in Gang setzen, deren Ablauf in Abbildung 5 dargestellt ist.

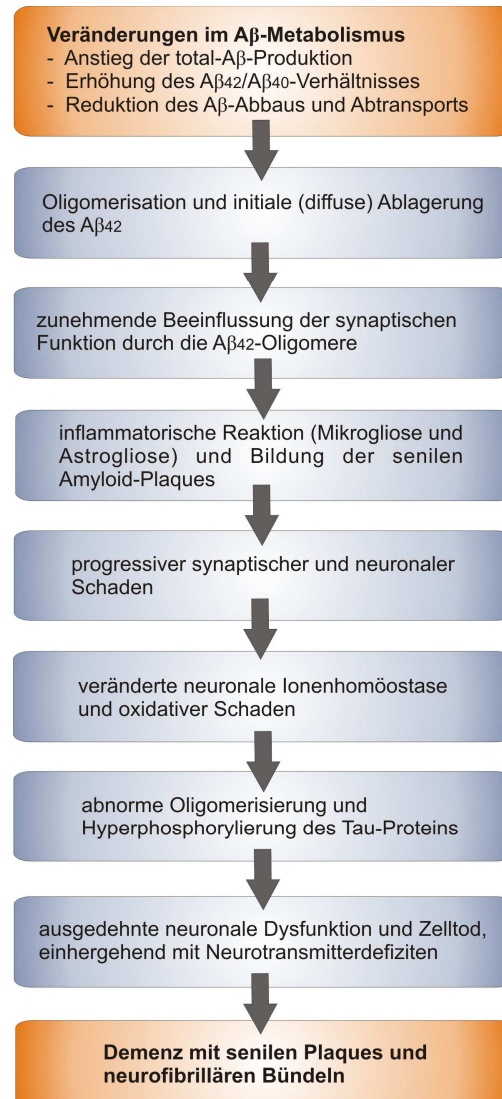


Abbildung 5:

Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese (modifiziert nach Haass und Selkoe, 2007)

Durch Veränderungen im Aβ-Metabolismus kommt es zur Oligomerisierung und Ablagerung des Aβ₄₂-Peptids. Initial aggregiert Aβ₄₂ in diffusen Plaques, welche zunehmend die synaptische Funktion beeinflussen. Die Bildung der (fibrillären) senilen Plaques führt neben einer inflammatorischen Reaktion zu einem progressiven synaptischen und neuronalen Schaden sowie veränderter neuronaler Ionenhomöostase und oxidativem Stress. Veränderungen von Kinasen und Phosphatasen führen zur Hyperphosphorylierung und Oligomerisierung des Tau-Proteins. Die daraus resultierende ausgedehnte neuronale Dysfunktion und Zelltod gehen mit Neurotransmitterdefiziten einher. Schließlich kommt es zur Manifestierung einer Demenz, die sich histopathologisch durch senile Plaques und neurofibrilläre Bündel äußert.

Eine Veränderung der β -Amyloid-Menge ist prinzipiell auf drei Arten möglich: Es kann zu einem Anstieg der totalen Aβ-Produktion kommen, der Aβ-Abbau bzw. der Abtransport kann verringert sein und es kann sich das Verhältnis Aβ₄₂/Aβ₄₀ erhöhen, was zu einer relativen

Erhöhung des A β_{42} führt. Insbesondere das Verhältnis A β_{42} /A β_{40} kann durch Mutationen der drei Gene, die die autosomal dominante familiäre Form der Alzheimer-Demenz verursachen, (*APP*, *PSEN1* und *PSEN2*, siehe Kapitel 1.5.1) beeinflusst werden. Diese relative Erhöhung des A β_{42} führt zu einer verstärkten Bildung löslicher Oligomere, welche die synaptische Funktion zunehmend beeinflussen. Parallel dazu kommt es zu einer Bildung von diffusen (nicht-fibrillären) Plaques, die aus A β_{42} bestehen. Im Zuge der fortschreitenden A β -Fibrillenbildung der Plaques kommt es zu lokalen inflammatorischen Prozessen wie Mikrogliose und Astroglie und zu neuronaler Dystrophie. Diese Prozesse resultieren in oxidativem Stress, veränderter Ionenhomöostase (z.B. Ca²⁺) und mehreren anderen biochemischen Veränderungen. Veränderte Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten führen zur Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und zur Bildung der neurofibrillären Bündel. Die Kaskade endet in ausgedehnter neuronaler Dysfunktion und Zelltod, der mit Neurotransmitterdefiziten einhergeht. Das Resultat ist die Manifestierung einer Demenz, die an den histopathologischen Merkmalen (senile Plaques und neurofibrillären Bündel) erkennbar ist (Haass und Selkoe, 2007 und Blennow *et al.*, 2006).

1.4.3 Tau-Protein und neurofibrilläre Bündel

Das Tau-Protein ist ein neuronales Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches vorrangig in Axonen lokalisiert ist. Die physiologische Funktion besteht in der Bindung und Stabilisierung des intrazellulären, mikrotubulären Systems. Eine Expression des Proteins findet in erster Linie in Axonen des zentralen und peripheren Nervensystems statt. Im menschlichen Gehirn existieren sechs Isoformen der Länge 352 bis 441 Aminosäuren, die durch alternatives mRNA-Spleißen der Exons 2, 3 und 10 entstehen (Grundke-Iqbal *et al.*, 2006). Die biologische Aktivität des Proteins wird über den Grad der Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen reguliert. Die Bindung an unterschiedliche Interaktionspartner kann durch Phosphorylierung spezifischer Stellen im Protein differenziell geregelt werden. Ebenso kann der Grad der Phosphorylierung über die Kompartimentierung des Proteins entscheiden. So ist in einem Neuron das Tau-Protein im somatodendritischen Kompartiment höher phosphoryliert als im Axon (Leschik, 2005). Liegt das Protein in einer hyperphosphorylierten Form vor, verliert es seine Bindungsfähigkeit an Mikrotubuli. Es kann seine stabilisierende Funktion dann nicht mehr ausüben, und nachfolgend kommt es zu einer Unterbrechung des axonalen Transportes, woraus wiederum neuronale Dysfunktion und schließlich eine irreversible neuronale Degeneration resultieren (Hampel *et al.*, 2003). Insbesondere die

Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) und die Cyclin-abhängige Proteinkinase 5 (cdk5) werden mit einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in Verbindung gebracht (Iqbal und Grundke-Iqbal, 2008).

Viele neurodegenerative Erkrankungen sind mit einer Aggregation des Tau-Proteins assoziiert und werden deshalb unter dem Begriff Tauopathien zusammengefasst. Dazu gehören unter anderem die frontotemporale Demenz und Parkinsonismus des Chromosom 17 (FTDP-17), Morbus Pick und die Alzheimer-Demenz. Im Gehirn eines Alzheimer-Patienten liegt das Tau-Protein in einer hyperphosphorylierten Form vor, die durch ein Ungleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Proteins zustande kommt. Während Tau normalerweise nur zwei oder drei Phosphatgruppen enthält, sind in cytosolischem hyperphosphorylierten Tau 5-9 mol Phosphat/mol des Proteins zu finden (Robert und Mathuranath, 2007). Eine Aggregation des hyperphosphorylierten Proteins zu den AD-typischen neurofibrillären Bündeln findet hauptsächlich in Form von gepaarten helikalen Filamenten (*paired helical filaments*, PHF) statt. Daneben treten auch die so genannten *straight filaments* (SF) auf, die im Gegensatz zu den PHF keine helikale Struktur aufweisen. Die neurofibrilläre Degeneration scheint für den klinischen Ausdruck der AD erforderlich zu sein, wohingegen β -Amyloid in der Abwesenheit der neurofibrillären Degeneration die Krankheit klinisch nicht in Erscheinung treten lassen kann (Iqbal und Grundke-Iqbal, 2008).

1.5 Risikofaktoren

1.5.1 Genetische Prädisposition

In genetischen Studien konnten drei Gene identifiziert werden, deren Mutationen die autosomal dominante familiäre Form der Alzheimer-Demenz verursachen. Dazu zählen das *APP*-Gen (*amyloid beta (A4) precursor protein*) selbst und die Gene *Präsenilin 1* (*PSEN 1*) und *Präsenilin 2* (*PSEN 2*), die für Proteine codieren, die Bestandteil des γ -Sekretase-Komplexes sind (Bertram und Tanzi, 2008).

Das *APP*-Gen ist auf Chromosom 21 lokalisiert und war das erste Gen, das mit der autosomal dominanten Form der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht werden konnte. Der Genlocus auf Chromosom 21 erklärt, warum Down-Syndrom-Patienten vermehrt an Alzheimer erkranken. Da sie drei Kopien des *APP*-Gens besitzen, wird mehr APP-Protein und somit auch mehr A β gebildet. Dadurch wird das Risiko der Bildung von senilen Plaques beträchtlich erhöht. Bis heute wurden 32 pathogene Mutationen des *APP*-Gens entdeckt

(Internetquelle 4). Diese führen zu Veränderungen der Proteinstruktur, welche innerhalb beziehungsweise nahe der A β -Region oder in der Nachbarschaft der Protease-Schnittstellen lokalisiert sind. Somit wird durch Mutationen die proteolytische Spaltung des APP-Proteins beeinflusst. Kürzlich entdeckte Mutationen betreffen die *APP*-Kopienanzahl oder die Transkriptionsrate des Gens (Brouwers *et al.*, 2008).

Genetische Kopplungsstudien zeigten jedoch, dass nicht alle familiären Fälle von AD auf einen genetischen Defekt auf Chromosom 21 zurückzuführen waren. Lediglich 1 % der familiären AD mit frühem Beginn kann mit Mutationen des *APP*-Gens in Verbindung gebracht werden. Im Zuge weiterer Studien wurde auf Chromosom 14 ein Genlocus entdeckt, der als *Präsenilin 1* (*PSEN1*) bezeichnet wurde. Das homologe Gen *Präsenilin 2* (*PSEN2*) ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Bis heute wurden 178 pathogene Mutationen des *PSEN1* und 18 des *PSEN2* identifiziert (Internetquelle 4). Die meisten *PSEN*-Mutationen verursachen eine typische Alzheimer-Demenz, die klinisch und pathologisch nicht von der sporadischen Form zu unterscheiden ist. Auffällig sind lediglich der schnellere und stärker ausgeprägte Krankheitsverlauf und das jüngere Alter der Patienten bei Krankheitsbeginn (Brouwers *et al.*, 2008). Dies ist auf eine vermehrte Bildung von A β ₄₂ im Vergleich zu A β ₄₀ zurückzuführen. Alle bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass die verschiedenen Punktmutationen mit einem unterschiedlichen Manifestationsalter der Alzheimer-Demenz verbunden sind. Mutationen im *PSEN1*-Gen können zu einem Ausbruch der Krankheit im Alter zwischen 30 und 40 Jahren führen und im *APP*-Gen zu einer Manifestation im Alter zwischen 40 und 50 Jahren. Bei Mutationen im *PSEN2*-Gen tritt die Krankheit hingegen zwischen 50 und 65 Jahren in Erscheinung (Hampel *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zur familiär vererbaren Alzheimer-Demenz steht die sporadische Form, deren Auftreten scheinbar nicht an Mendelsche Vererbung geknüpft ist. Trotz vieler genetischer Assoziationsstudien konnte bislang nur eine genetische Variante (Polymorphismus) des Apolipoprotein-E-Allels (*APOE*-Allel), nämlich das *APOE* ϵ 4, als Risikofaktor für die sporadische Form der AD erkannt werden (Bertram und Tanzi, 2008, siehe Kapitel 2).

1.5.2 Weitere Risikofaktoren

Neben der genetischen Prädisposition existieren noch weitere Risikofaktoren für die Manifestation einer Alzheimer-Demenz. Insbesondere ein hohes Lebensalter kann als ein Hauptrisikofaktor angesehen werden. Wie schon in Kapitel 1.2 erwähnt, steigt die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung mit zunehmendem Alter exponentiell an

(Weyerer, 2005). Es fällt auf, dass insbesondere in den höheren Altersgruppen mehr Frauen als Männer von der Krankheit betroffen sind. Obwohl die Anfälligkeit beider Geschlechter in gleichem Maße ausgeprägt ist, sind ungefähr 70 % aller Alzheimer-Patienten weiblich. Dies dürfte jedoch lediglich auf die höhere Lebenserwartung von Frauen zurückzuführen sein (Bickel, 2008).

Neben Alter und genetischer Prädisposition werden noch eine ganze Reihe weiterer Risikofaktoren mitunter kontrovers diskutiert. Dazu gehören Bluthochdruck, erhöhte Cholesterinwerte, traumatische Kopfverletzungen, Diabetes mellitus, Schlaganfall, chronisch-inflammatorische Prozesse und auch der Bildungsgrad (Diamond, 2005). Das Vorhandensein der Diskrepanz zwischen einer kognitiven Beeinträchtigung und den pathologischen Veränderungen führte zur Hypothese der „kognitiven Reserve“ (Keller, 2006). So sind Individuen, je nach Größe ihrer kognitiven Fähigkeiten, in der Lage, die Symptome der Krankheit zu kompensieren und herauszuzögern. Komponenten die diese Reserve beeinflussen, sind unter anderem der Bildungsgrad und fortwährende intellektuelle Beschäftigung (Whalley *et al.*, 2004).

1.6 Symptome und Diagnostik

Typisch für den Verlauf der Alzheimer-Demenz ist ein schleichender Beginn der Krankheit. Am Anfang stehen hauptsächlich Gedächtnis- und Wortfindungsstörungen, gefolgt von Defiziten in der zeitlichen und räumlichen Orientierung. Im frühen Stadium der Krankheit ist eine Persönlichkeitsveränderung noch nicht zu beobachten (Herdegen *et al.*, 1997). Ein weiterer Verlust der kognitiven Fähigkeiten führt in späteren Stadien über zunehmende Einschränkung der Alltagskompetenz bis hin zur Pflegebedürftigkeit und Bettlägerigkeit der Patienten. Im letzten Stadium der Krankheit kommt es zu einem raschen körperlichen Verfall und starkem Gewichtsverlust. Der Tod tritt meist infolge von Infektionskrankheiten oder anderer unspezifischer Ursachen ein (Hampel *et al.*, 2003).

Der Verlauf der Alzheimer-Demenz kann in drei Stadien eingeteilt werden, die mit den begleitenden Symptomen in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1:

Einteilung und Symptomatik der Alzheimer Demenz (modifiziert nach Internetquelle 1, 2, 3 und Lange, 2008)

Stadium	Symptome
I Vergesslichkeit	<ul style="list-style-type: none">- Amnesie- Aphasie- leichte Gemütsschwankungen- Orientierungslosigkeit- Depressionen- Verwirrtheit- beginnende Persönlichkeitsveränderungen
II ausgeprägte Ausfälle	<ul style="list-style-type: none">- emotionale Instabilität mit plötzlichen Stimmungswechseln (Affektlabilität)- ausgeprägte Vergesslichkeit, Wortfindungsstörungen und Orientierungslosigkeit- Auftreten zwanghafter Verhaltensweisen- Wahrnehmungsstörungen- Störungen komplexerer Bewegungsabläufe bis hin zur Pflegebedürftigkeit
III Verlust der Persönlichkeit	<ul style="list-style-type: none">- gänzlicher Verlust der Gedächtnisleistung und der Persönlichkeit- Echolalie und Palilalie bis hin zu dementiellem Sprachzerfall- Inkontinenz- Schluckstörungen- Apathie- komplette Pflegebedürftigkeit

Bisher gibt es zur Diagnose der Alzheimer-Demenz noch keine spezifisch definierten biologischen Marker, d.h. eine sichere Diagnose ist nach wie vor nur *post mortem* durch eine pathologische Autopsie des Gehirns möglich. Um jedoch den Verlauf der Krankheit positiv beeinflussen zu können, ist eine sichere Diagnose unabdingbar. Diese kann im klinischen Alltag durch Begutachtung von Anamnese und Krankheitsverlauf in Kombination mit Zusatzuntersuchungen gestellt werden. Dazu gehören Laboruntersuchungen (z.B. Blutuntersuchungen und Liquordiagnostik) und bildgebende Verfahren wie CT und MRT. Ebenso finden neurophysiologische (z.B. Elektroenzephalographie – EEG) und neuropsychologische Tests Anwendung. Beispiele hierfür wären die *Mini-Mental-State-Examination* (MMSE) oder der Uhrentest. Viele der Zusatzuntersuchungen dienen hauptsächlich dem Ausschluss anderer, potentiell behandelbarer Krankheiten (Hampel *et al.*, 2003). International wird die Diagnose Alzheimer-Demenz anhand der ICD-10- oder DSM-IV-Kriterien gestellt.

1.7 Therapie der Alzheimer-Demenz

Die Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung ist ein therapeutisches Gesamtkonzept bestehend aus medikamentöser und psychosozialer Behandlung der Patienten. Die nicht-medikamentöse Therapie beruht auf einer Vielzahl von Ansätzen mit dem Ziel, die Pflegebedürftigkeit des Erkrankten so lange wie möglich hinauszuzögern, die Lebensqualität zu steigern und einen möglichst langen Verbleib in der vertrauten Umgebung zu gewährleisten. Anwendung finden hier Verhaltenstherapie, kognitives Training, Realitätsorientierung, Erinnerungstherapie und Selbst-Erhaltungs-Therapie (Gutzmann, 2000).

Bisher gibt es keine Behandlungsstrategie, die die organischen Veränderungen im Gehirn des Erkrankten stoppen kann. Somit zielt der medikamentöse Therapieansatz darauf ab, den Verlauf der Krankheit zu verlangsamen und Symptome zu behandeln. Da die Alzheimer-Demenz gekennzeichnet ist durch Störungen in den Bereichen Gedächtnis bzw. Denkvermögen und emotionaler Kontrolle, gliedert sich die medikamentöse Therapie in die Behandlung kognitiver Störungen durch Antidementiva (vor allem Acetylcholinesterase-Hemmer und Glutamat-Antagonisten) und die Behandlung der nicht-kognitiven Störungen wie Wahnvorstellungen, psychotischen Syndromen, Angstzuständen oder Depressionen durch Neuroleptika bzw. Antidepressiva. Die Pharmakotherapie ist abhängig vom Schweregrad der Krankheit. So werden Antidepressiva und Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer) hauptsächlich bei leichter AD angewendet, während Glutamat-Antagonisten bei moderater bis schwerer Symptomatik Einsatz finden. Neuroleptika werden vorwiegend im letzten Stadium der Krankheit verordnet (Abbildung 6).

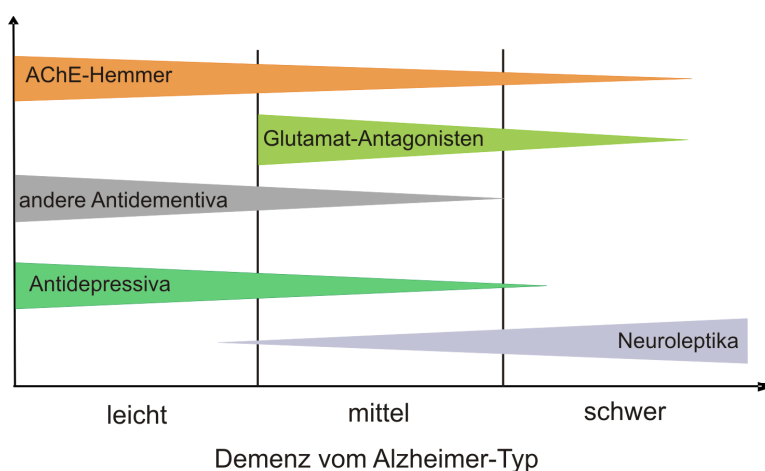


Abbildung 6:
Stadien- und symptomgerechter Einsatz von Antidementiva und Psychopharmaka bei Alzheimer-Demenz (modifiziert nach Schweiger, 2008).

1.7.1 Behandlung der kognitiven Symptomatik

Zur Behandlung der kognitiven Symptomatik der Alzheimer-Demenz werden Antidementiva und Nootropika eingesetzt. Diese Arzneimittel sollen Hirnfunktionen wie Gedächtnis, Lernen, Auffassungs-, Denk- und Konzentrationsfähigkeit verbessern. Als Antidementiva werden Substanzen bezeichnet, die in der Indikation Alzheimer-Demenz geprüft wurden. Hierzu gehören die Acetylcholinesterase-Hemmer und der selektive nicht-kompetitive NMDA-(N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptorantagonist Memantin. Nootropika hingegen sind Substanzen mit vigilanzsteigernden Effekten.

1.7.1.1 Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer)

Im Gehirn fungiert der Neurotransmitter Acetylcholin als Aktivator der muscarinischen und nicotinischen Acetylcholinrezeptoren. Die Menge des verfügbaren Transmitters wird durch die Aktivität des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) bestimmt, das durch Spaltung von Acetylcholin zu Cholin und Acetat den Neurotransmitter inaktiviert. *Post-Mortem*-Studien führten schon in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts zu der Erkenntnis, dass sich in Gehirnen der Alzheimer Patienten im fortgeschrittenen Stadium eine deutliche Reduktion der Aktivität der zentralen cholinergen Neuronen einstellt (Davies, 1976). Besonders betroffen sind Gehirnareale wie der Nucleus basalis Meynert oder cholinerge Axone im Cortex. Da diese Bereiche mit Lernen, Gedächtnis und emotionalen Reaktionen assoziiert sind, führt ein Verlust der cholinergen Aktivität zu Einbußen der kognitiven Funktion. Aufgrund dieser Erkenntnis erfolgten viele Bestrebungen, dieses Defizit auszugleichen und somit die dementielle Symptomatik zu behandeln. Der Einsatz von Acetylcholin-Vorläufersubstanzen als Nahrungsergänzungsmittel zeigte keinen Effekt (IQWiG, 2007). Auch ist eine Erhöhung der cholinergen Aktivität der Neurone durch die Gabe von cholinergen Agonisten (cholinerg stimulierenden Substanzen) nicht möglich, da bislang kein Präparat zum klinischen Einsatz verfügbar ist. Somit sind Substanzen, die das Enzym Acetylcholinesterase hemmen, die einzige Möglichkeit, die Menge von verfügbarem Acetylcholin im synaptischen Spalt zu beeinflussen. Durch die Gabe von AChE-Hemmern kann der Abbau des Neurotransmitters verlangsamt und die Konzentration im synaptischen Spalt erhöht werden. Aktuell sind für Deutschland drei Präparate zugelassen: Donepezil (seit 1996), Rivastigmin (seit 1998) und Galantamin (seit 2001). Das 1995 zugelassene Tacrin ist mittlerweile aufgrund von Hepatotoxizität nicht mehr im Handel erhältlich. Der Nutzenbewertung der Behandlung mit Acetylcholinesterase-Hemmern bei Alzheimer-Demenz des Instituts für Qualität und

Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) ist zu entnehmen, dass die drei zugelassenen Präparate Donepezil, Rivastigmin und Galantamin einen Nutzen bezüglich des Therapieziels der kognitiven Leistungsfähigkeit bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer Alzheimer-Demenz zeigen. Ebenso gibt es Hinweise auf eine positive Beeinflussung des Therapieziels „Aktivitäten des täglichen Lebens“ (IQWiG, 2007).

1.7.1.2 Selektiver nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin

Im Gehirn ist Glutamat der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter, der mit Lernen, Gedächtnisprozessen und neuronaler Plastizität verbunden ist. Eine physiologische, kurzzeitige Glutamatfreisetzung ist die Grundlage für Gedächtnisbildung und Lernprozesse. Eine exzessive Freisetzung führt jedoch zu einer gestörten Neurotransmission und spielt somit in der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems eine bedeutende Rolle. Durch Glutamat-gesteuerte Aktivierung des NMDA-Rezeptors kommt es zu einem anhaltend erhöhten Einstrom von Calciumionen. Dies führt zu einer Störung der intrazellulären Calcium-Homöostase und somit zu einem Funktionsverlust und letztendlich dem Untergang der Neurone. Zur Unterbindung dieses Prozesses wird das Adamantan-Derivat Memantin eingesetzt. Dieser selektive, nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist ist in Deutschland zur Therapie der moderaten bis schweren Alzheimer-Demenz zugelassen. Memantin soll zu einer Blockade der pathologischen Wirkung des Glutamat-überschusses führen, ohne jedoch gleichzeitig die physiologische Neurotransmitterfunktion des Glutamats zu beeinträchtigen (Schweiger, 2008). Laut vorläufigem Fazit im Vorbericht des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG, 2008a) bleibt es jedoch vorerst noch unklar, ob Patienten von einer Behandlung mit Memantin profitieren. Da von elf relevanten Studien nur vier in die Nutzenbewertung einfließen konnten, ist die Datenlage unzureichend. Hinweise auf eine positive Beeinflussung des Erhalts alltagspraktischer Fähigkeiten durch eine Monotherapie gibt es lediglich für die Untergruppe der Patienten mit moderater AD-Symptomatik. In Kombinationstherapie mit dem Cholinesterasehemmer Donepezil liegt bezüglich der Zielgröße „begleitende psychopathologische Symptome“ ein Hinweis auf einen Nutzen vor. Dieser Effekt ist eher als klein einzustufen, da er deutlich unterhalb einer halben Standardabweichung liegt.

1.7.1.3 Nootropika

Eine Entwicklung der Nootropika fand vor allem in den 1970er und 1980er Jahren statt. In zahlreichen Studien, die jedoch nicht mehr den heutigen Standards entsprechen, wurde eine Wirkung der Substanzen bezüglich der Lern- und Gedächtnisschwäche nachgewiesen. Zwar gibt es auch neuere klinische Studien, die eine antidementive Wirkung bis zu einem gewissen Grad bestätigen, jedoch erschweren die uneinheitlichen Indikationen der Nootropika eine vergleichende Bewertung (Schweiger, 2008).

Derzeit in Deutschland zugelassene und positiv monographierte Nootropika sind der Calciumantagonist Nimodipin, die Mutterkornalkaloid-Derivate Dihydroergotoxin(-mesilat) und Nicergolin, Piracetam, das Pyridoxinderivat Pyritinol sowie der *Ginkgo-biloba*-Extrakt, welcher in der Praxis das wichtigste Nootropikum darstellt. Schon 1965 wurden in Deutschland ginkgohaltige Präparate eingeführt. Unabhängig vom Schweregrad sind diese zur Therapie der Demenz als Arzneimittel zugelassen. Die am häufigsten verwendeten Extrakte der Pflanze *Ginkgo biloba* L. sind die standardisierten Blattextrakte EGb761[®] und LI 1370. Deren Herstellung erfolgt in einem vielstufigen Extraktionsverfahren, bei welchem die pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe wie Flavonglykoside und Terpenlactone angereichert und nicht erwünschte Komponenten wie Ginkgolsäuren abgereichert werden. Die dem Extrakt zugeschriebenen Wirkungen umfassen die Erhöhung des cerebralen Blutflusses, die Modifizierung verschiedener Neurotransmittersysteme, Radikalfängereigenschaften und die Verringerung der Viskosität des Blutes. Letzteres wird allerdings kontrovers diskutiert (IQWiG, 2008b). Eine Nutzenbewertung kann dem Abschlussbericht „Ginkgohaltige Präparate bei Alzheimer-Demenz“ des Instituts für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG, 2008b) entnommen werden. Ein belegter Nutzen konnte für den Spezialextrakt EGb761[®] in der Dosierung 240 mg für das Therapieziel „Aktivitäten des täglichen Lebens“ gezeigt werden. Hinweise auf einen Nutzen der Ginkgo-Zubereitungen existieren für die Therapieziele „kognitive Fähigkeiten“, „allgemeine psychopathologische Symptome“ und „Lebensqualität der (betreuenden) Angehörigen“. Der Nutzen basiert allerdings auf sehr heterogenen Ergebnissen und somit können zum Ausmaß eines möglichen Effekts keine zusammenhängenden Aussagen getroffen werden.

1.7.2 Behandlung der nicht-kognitiven Symptomatik

Nicht-kognitive Störungen treten häufig in fortgeschrittenen Stadien der Alzheimer-Demenz auf. Der Einsatz von Psychopharmaka erfolgt, wenn nicht-medikamentöse Therapien und Antidementiva nur noch unzureichende Ergebnisse liefern und die Verhaltensstörungen sowohl für den Patienten als auch für das Umfeld eine große Belastung darstellen. Zu den behandlungsbedürftigen Symptomen zählen Unruhe, Wahn, Aggressivität, Schlafstörungen und Depressionen.

Da rund ein Drittel aller Demenzpatienten im Laufe der Erkrankung depressiv wird, ist häufig ein Einsatz von Antidepressiva in Kombination mit psychotherapeutischen und psychosozialen Strategien nötig. Hierbei erfolgt aufgrund der unzureichenden und widersprüchlichen Studienlage bei der Substanzwahl eine Orientierung am Nebenwirkungsprofil. Mittel der ersten Wahl sind selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI). Daneben werden auch neuere Antidepressiva wie Mirtazapin oder Moclobemid eingesetzt. Aufgrund der anticholinergen Nebenwirkungen und des kardialen Risikos wird der Einsatz tri- oder tetrazyklischer Antidepressiva vermieden.

Zur Therapie von psychotischen Symptomen und Aggressivität kommen vor allem niedrig dosierte Neuroleptika zum Einsatz. Das Mittel der ersten Wahl ist hier Risperidon, welches als einzige Substanz formal zur Anwendung im Rahmen der Therapie einer Demenz-Erkrankung zugelassen ist. Weiterhin finden Clozapin (besonders bei Patienten mit Parkinsonsymptomatik), Melperon und Pipamperon Einsatz.

Bei Unruhezuständen und Schlafstörungen sollten vorrangig nicht-medikamentöse Strategien wie schlafhygienische Maßnahmen und körperliche Aktivierung angewandt werden. Reichen diese nicht aus, können Benzodiazepine mit kürzerer Halbwertszeit und einem Metabolismus ohne wirksame Metaboliten wie Lorazepam oder Oxazepam verabreicht werden. Zolpidem und Zopiclon sind ebenso geeignet. Sedierende Neuroleptika wie Melperon und Pipamperon sowie sedierende Antidepressiva wie Mirtazapin haben ebenso einen wichtigen Stellenwert in der Therapie von Schlafstörungen (Schweiger, 2008 und Niklewski, 2006).

1.7.3 Neue Therapieansätze

Da sich das Wissen auf dem Gebiet der Pathogenese der Alzheimer-Demenz in den letzten Jahren ständig erweitert hat, befindet sich die Therapie der Krankheit im Wandel. Herkömmliche, nur auf eine symptomatische Therapie zielende medikamentöse Behandlungsmethoden sollen durch neue pharmakologische Strategien ersetzt werden, die die

pathologischen Mechanismen der Krankheit modifizieren. Im Vordergrund der Forschung stand bis jetzt die Inhibition der A β -Produktion und -Aggregation sowie der A β -Abbau und -Abtransport. Angriffsmöglichkeiten sind hier die Sekretasen. So kann durch Hemmung der β - oder γ -Sekretase oder durch Stimulation der α -Sekretase die APP-Prozessierung in den nicht-amyloidogenen Weg umlenkt werden. Auch die aktive oder passive Immunisierung gegen die A β 42-Aggregation wird erprobt (Schweiger, 2008). Eine weitere Therapieoption liegt in der Reduzierung der Tau-Pathologie. Hier wären Arzneistoffe denkbar, die die Phosphorylierung von Tau beeinflussen oder dessen Aggregation inhibieren. So befinden sich z.B. der Tau-Aggregationsinhibitor Rember in Phase III einer klinischen Studie, und auch der Mikrotubulistabilisator NAP (AL-108) wird in Phase-II-Studien getestet (Rafii und Aisen, 2009).

Ebenso haben epidemiologische Studien zu neuen Therapieansätzen geführt. Anhand von Beobachtungsstudien konnten mehrere Arzneistoffe bzw. Nahrungsergänzungsmittel identifiziert werden, die einen protektiven Effekt aufweisen. Dieser war jedoch in randomisierten kontrollierten Studien schwer zu reproduzieren beziehungsweise zu verifizieren. Zu nennen wären hier nichtsteroidale Antirheumatika, cholesterinsenkende Arzneimittel (Statine), Estrogene und Antioxidantien (Blennow *et al.*, 2006).

2 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) wird mit vielen biochemischen Störungen der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung gebracht. Dazu gehören A β -Ablagerungen, Bildung neurofibrillärer Bündel, Lipid-Dysfunktion, Verlust synaptischer Plastizität, cholinerge Dysfunktion und Unterbrechung von Signalwegen (Cedazo-Mínguez, 2007). Wie schon in Kapitel 1.5.1 erwähnt, gehört das Vorhandensein des *Apolipoprotein-E4*-Allels (*APOE ϵ 4*) in heterozygoter oder homozygoter Form zu den wichtigsten Risikofaktoren der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz. Im Folgenden soll das Protein hinsichtlich Funktion, Aufbau, Expression und seiner Rolle bei der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz näher betrachtet werden.

2.1 Struktur und Funktion

ApoE wurde 1973 von Shore und Shore als Lipoprotein-Bestandteil in dem *Very-Low-Density-Lipoprotein* (VLDL) entdeckt und ursprünglich als „Arginin-reiches Apoprotein“ bezeichnet (Mahley, 1988). ApoE gehört zu den Apolipoproteinen, welche für den Lipidtransport im Körper zuständig sind. Da sowohl Triglyceride als auch Cholesterol wasserunlöslich sind, müssen sie zum Transport in wässrigen Medien (Lymphe und Blut) „verpackt“ werden. Dazu werden die Lipide mit einer Schicht aus Phospholipiden umgeben, in welche die Apolipoproteine eingelagert sind. ApoE ist Bestandteil von Chylomikronen, VLDL und dem *High-Density-Lipoprotein* (HDL). Durch die im Darmepithel gebildeten Chylomikronen werden unter Umgehung der Leber Fettsäuren über die Blutbahn in verschiedene Gewebe abgegeben. Auch das in der Leber gebildete VLDL stellt die Versorgung der Gewebe mit Fettsäuren sicher. HDL-Partikel hingegen sind in der Lage, Cholesterol von Zellen abzunehmen und an *Low-Density-Lipoprotein*-Partikel (LDL-Partikel) weiterzugeben, um so Cholesterol von den Geweben der Leber zuzuführen (Lüllmann und Mohr, 2001). Somit ist ApoE Bestandteil der Verteilung sowohl von endogen synthetisierten als auch von durch die Nahrung aufgenommenen Triglyceriden und Cholesterol.

Eine weitere Funktion des ApoE ist die Fähigkeit, den anabolen und katabolen Metabolismus von Lipoproteinen zu beeinflussen. Die Rate der Lipolyse von Lipoprotein-Triglyceriden wird durch die Akkumulation von ApoE auf der Oberfläche des Lipoproteins gesteuert. Je mehr ApoE sich an der Oberfläche befindet, desto langsamer werden Triglyceride abgespalten. Auch kann der Plasma-Spiegel von VLDL direkt durch ApoE beeinflusst werden, da eine Erhöhung der VLDL-Synthese und -Sekretion mit erhöhter Synthese und Sekretion von ApoE durch die Leber einhergeht (Mahley und Rall, 2000).

Im Gehirn ist ApoE das häufigste Apolipoprotein. Es ist auch dort für den Transport und die Verteilung von Cholesterol zuständig. Die ApoE-Lipid-Komplexe haben im Gehirn etwa die gleiche Größe wie HDL-Partikel (Björkhem und Meaney, 2004). Die Bildung von ApoE findet im Körper in verschiedenen Organen statt. Dazu gehören unter anderem Leber, Gehirn, Milz, Niere und Nebenniere. Etwa 75 % des im Plasma zirkulierenden ApoE wird in der Leber gebildet. Diese ist somit der Hauptort der ApoE-mRNA-Expression im Körper (Laws *et al.*, 2003). An zweiter Stelle steht das Gehirn. Dort wird ApoE hauptsächlich von Astrozyten gebildet und sezerniert. Unter verschiedenen physiologischen wie pathologischen Gegebenheiten erfolgt auch in Neuronen im Zentralnervensystem (ZNS) die Expression von ApoE, obgleich in deutlich geringerem Umfang als in Astrozyten.

ApoE spielt im Hirn eine Rolle bei der Erhaltung und Reparatur von Neuronen. Es nimmt Lipide auf, die durch neuronale Degeneration freigesetzt wurden, und verteilt diese an Zellen, die sie zur Proliferation, zur Reparatur von Membranen oder zur Myelinisierung von neuen Axonen benötigen (Huang *et al.*, 2004). Die Aufnahme des Lipoproteins in Zellen findet durch verschiedene Rezeptoren statt. Dazu gehören der *Low-Density-Lipoprotein*-(LDL)-Rezeptor, das *receptor related protein* (LRP), der ApoE- Rezeptor 2, der *Very-Low-Density-Lipoprotein*- (VLDL)-Rezeptor und Megalin (Cedazo-Mínguez, 2007).

2.2 Vorkommende Isoformen des ApoE-Proteins

Ende der 1970er Jahre erkannten Utermann *et al.* (1977) die Polymorphie des ApoE-Proteins durch die Detektion verschiedener Isoformen mittels isoelektrischer Fokussierung. Der Einsatz zweidimensionaler elektrophoretischer Techniken zur Aufklärung der komplexen Isoform-Muster durch Zannis *et al.* (1981) trug zusätzlich zum Verständnis der ApoE-Polymorphismen bei. Die Analyse der ApoE-Isoformen aus dem Plasma verschiedener Individuen zeigte zwei Polymorphismus-Typen, von welchen nur einer genetisch bedingt ist. Dieser lässt sich auf die Allele *APOEε2*, *APOEε3* und *APOEε4* zurückzuführen, die für die drei Hauptisoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 des Proteins kodieren. Daneben existieren noch die sehr seltenen *APOE*-Varianten *APOEε1*, *APOEε5* und *APOEε7*. Die Analyse der Aminosäuresequenz zeigte, dass sich die drei Hauptisoformen durch einen Aminosäure-Austausch an den Positionen 112 und 158 unterscheiden. In der am weitesten verbreiteten Isoform ApoE3 finden sich an Position 112 die Aminosäure Cystein und an Position 158 Arginin. ApoE4 liegt vor, wenn das Cystein-112 durch ein Arginin substituiert ist, und ApoE2 entsteht durch eine Substitution des Arginin-158 durch Cystein. Der Aminosäure-Austausch entsteht jeweils nur durch eine Substitution eines einzelnen Basenpaares (Abbildung 7).

	Position 112				Position 158			
<i>APOEε2</i>	GAC	GTG	TGC	GGC CGC CTG.....CTG CAG AAG	TGC	CTG	GCA	
<i>APOEε3</i>	GAC	GTG	TGC	GGC CGC CTG.....CTG CAG AAG	CGC	CTG	GCA	
<i>APOEε4</i>	GAC	GTG	CGC	GGC CGC CTG.....CTG CAG AAG	CGC	CTG	GCA	

TGC = Cystein
CGC = Arginin

Abbildung 7:
Isoform-bestimmende Basentriplets der Aminosäuren 112 und 158 Ausschnitt aus der Sequenz des humanen *APOE*-Gens (modifiziert nach Laws et al. 2003).

Somit unterscheiden sich die gebildeten Proteine auch hinsichtlich ihrer Ladung. Aufgrund des doppelten Vorkommens von Arginin ist ApoE4 das basischste Protein. ApoE3 unterscheidet sich in einer Ladungseinheit durch das Cystein an Position 112 und ApoE2 in zwei Ladungseinheiten durch Cystein an den Positionen 112 und 158. Somit kann dem Protein ApoE2 eine relative Ladung von 0, ApoE3 von +1 und ApoE4 von +2 zugewiesen werden (Mahley und Rall 2000, Laws *et al.* 2003).

Durch das Vorhandensein der drei Allele *APOEε2*, *APOEε3* und *APOEε4* kann es zur Bildung von sechs verschiedenen Genotypen kommen. Es gibt die Möglichkeit der homogenen Genotypen *APOEε2/ε2*, *APOEε3/ε3* und *APOEε4/ε4* und der heterogenen Genotypen *APOEε2/ε3*, *APOEε3/ε4* und *APOEε2/ε4*. In Deutschland ist *APOEε3/ε3* mit einer Prävalenz von ca. 60 % der am weitesten verbreitete Genotyp, gefolgt von *APOEε3/ε4* (23 %). Mit nur 1 % Prävalenz ist *APOEε2/ε2* am seltensten. Die Prävalenzen der übrigen Genotypen liegen zwischen 2 und 12 % (Utermann *et al.*, 1982).

Der zweite, nicht genetisch bedingte Polymorphismus-Typ geht auf Unterschiede in der posttranslationalen Sialylierung des Proteins zurück, welche eine zusätzliche negative Ladung mit sich bringt. Es kommt zu einer O-Glycosilierung am Threonin-194 des reifen Proteins bei ca. 10-20 % des ApoE im Plasma. Nicht sialylierten Isoformen des ApoEs fehlen somit nicht nur N-Acetylneuraminsäure sondern auch die neutralen Zucker (Mahley und Rall, 2000).

2.3 Proteinstruktur

Das *APOE*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 19 (Bande 19q13.2) lokalisiert. Es besteht aus vier Exons und drei Introns und ist 3,7 kb groß. In direkter Nähe befinden sich das Gen für das Apolipoprotein C-I und ein ApoC-I-Pseudogen. Das primäre Translationsprodukt, das ApoE-Vorläuferprotein, besteht aus 317 Aminosäuren, wobei 18 N-terminale Aminosäuren als Signalpeptid fungieren. Nach Prozessierung ist das reife Protein 299 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht $M_r = 34.200$ Da (Mahley, 1988).

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, kann das ApoE-Protein strukturell in zwei Domänen aufgeteilt werden: den N-Terminus und den C-Terminus. Die N-terminale Domäne ist 22 kDa groß und besteht aus den Aminosäuren 1-199. Das Andocken von ApoE an LDL-Rezeptoren wird über diese Domäne vermittelt, da sie die LDL-Rezeptor-Bindungsregion enthält. Ebenso ist eine Heparin-Bindestelle im N-Terminus zu finden. Die C-terminale Domäne besteht aus den Aminosäuren 216-299 und hat eine Größe von 10 kDa. In diesem Bereich ist die Haupt-Lipid-Bindungsstelle lokalisiert.

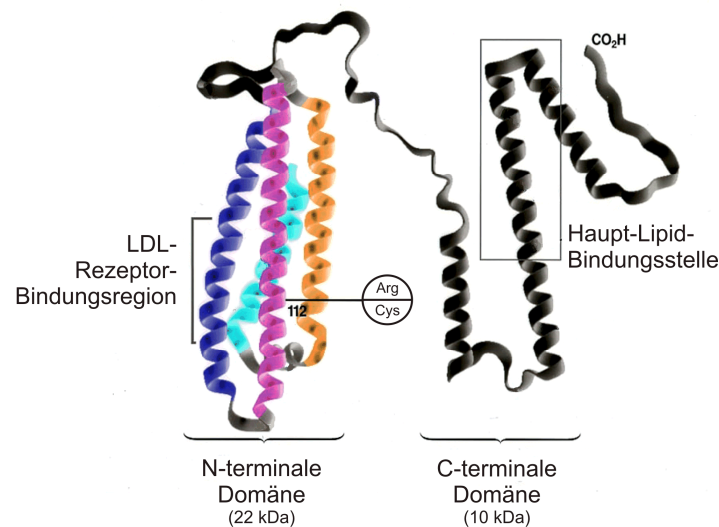


Abbildung 8:
Modell-Darstellung des humanen Apolipoprotein E (modifiziert nach Huang *et al.*, 2001).

Wie schon in Kapitel 2.2 beschrieben, ist die Aminosäure an Position 112 Isoformbestimmend. Der Aminosäureaustausch Arginin-Cystein resultiert in einer Konformationsänderung der Proteinstruktur durch eine Interaktion des N- und des C-Terminus. Das Arginin-112 ermöglicht die Bildung einer Salzbrücke zwischen Arginin-61 und Glutamat-255. Die Folge der Domäneninteraktion ist eine Veränderung der Bindungseigenschaften des Proteins. ApoE3 und ApoE2 binden bevorzugt an kleine, phospholipidreiche HDL-Partikel, ApoE4 hingegen an große, triglyceridreiche VLDL-Partikel. Ebenso können die erhöhte Proteolyseanfälligkeit des ApoE4 und die Stimulation der A β -Produktion durch ApoE4 auf diese Domäneninteraktion zurückgeführt werden (Huang *et al.*, 2004).

2.4 Rolle des Apolipoprotein E bei der Alzheimer-Demenz

Wie bereits erwähnt, kann das Apolipoprotein E mit vielen biochemischen Störungen der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht werden: A β -Ablagerungen, Bildung neurofibrillärer Bündel, Lipid- und cholinerge Dysfunktion sowie die Unterbrechung von Signalwegen. Insbesondere das *APOE ϵ 4*-Allel ist als Risikofaktor für die Entwicklung der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz bekannt. Liegt bei einem Patienten der Genotyp *APOE ϵ 4/ ϵ 4* vor, kommt es im Vergleich zu Nicht-*APOE ϵ 4*-Trägern zu einem früheren Ausbruch der Krankheit, zum vermehrten Auftreten von Amyloid-Plaques, zu cerebrovasculärer Amyloid-Ablagerung und einer Reduktion der Cholinacetyltransferase

sowie der Dichte der nicotinergen und *Nerve-Growth-Factor*-(NGF)-Rezeptoren (Poirier, 2008).

2.4.1 ApoE und A β

Es ist grundsätzlich davon auszugehen, dass die pathologischen Effekte des Apolipoprotein E zum Teil auf die Interaktionen mit der A β -Kaskade zurückzuführen sind, da das ApoE in den Plaques anzutreffen ist. Eine Erhöhung der A β -Level ist zu beobachten, wenn ein *APOE ϵ 4*-Allel vorliegt. Dies wurde durch *Post-Mortem*-Studien bestätigt, welche zeigten, dass eine erhöhte A β -Ablagerung bei *APOE ϵ 4*-Trägern sowohl bei der sporadischen als auch bei der familiären AD auftritt. Weiterhin ist beschrieben, dass ApoE4 die Synthese von A β durch Begünstigung des intrazellulären APP-Recyclings fördert. *In-Vitro*-Daten zeigten, dass ApoE die Neurotoxizität von A β isoformabhängig ($E4 > E3$) erhöht. Diese Erkenntnisse deuten einen synergistischen pathologischen Effekt zwischen A β und ApoE4 an (Cedazo-Mínguez, 2007).

2.4.2 ApoE und neurofibrilläre Bündel

In Gehirnen von Alzheimer-Patienten ist das Tau-Protein hyperphosphoryliert und lagert sich in pathologisch gepaarten helikalen Filamenten zusammen. *In-vitro*-Studien konnten zeigen, dass ApoE3 und ApoE4 sich in ihrem Effekt auf die Phosphorylierung und Aggregation von Tau unterscheiden. ApoE3 bildete einen SDS-stabilen Komplex mit Tau, wohingegen mit ApoE4 keine signifikante Interaktion zu beobachten war. Fand eine Phosphorylierung des Tau-Proteins statt, wurde die Interaktion zwischen Tau und ApoE3 unterbunden (Strittmatter *et al.*, 1994). Das lässt darauf schließen, dass das Protein nur an nicht-phosphoryliertes Tau bindet. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ApoE3 in der Lage sein könnte, eine Hyperphosphorylierung und Destabilisierung des neuronalen Zytoskeletts zu verhindern. In Studien mit transgenen Mäusen konnte herausgefunden werden, dass eine erhöhte Tau-Phosphorylierung in Tieren auftrat, die humanes ApoE4 in Neuronen exprimierten, nicht aber in Tieren mit ApoE4-Expression in Astrozyten. Somit ist ein Neuronen-spezifischer Effekt von ApoE4 auf die Tau-Phosphorylierung denkbar. Für die Bindung an Tau-Proteine ist die N-terminale Domäne des ApoE3 verantwortlich. Im Mausmodell wurde weiterhin festgestellt, dass C-terminal verkürztes ApoE möglicherweise die Tau-Phosphorylierung und die Bildung NFT-ähnlicher Einschlussformen stimuliert (Huang *et al.*, 2004).

2.4.3 ApoE, Cholesterol und synaptische Reparatur

Die Hauptfunktion des Apolipoprotein E besteht in der Verteilung von Lipiden und der Beteiligung an der Cholesterol-Homöostase. Die strukturellen Unterschiede der verschiedenen Protein-Isoformen führen zu Veränderungen im Gehirn, die die Cholesterol-Aufnahme in Zellen sowie den Efflux betreffen. Im Vergleich zu den Isoformen ApoE2 und ApoE3 wurde festgestellt, dass in kultivierten Neuronen die Cholesterol-Aufnahme niedriger war, wenn das Lipid an ApoE4 gebunden war (Rapp *et al.*, 2006). Weiterhin zeigt ApoE4 eine geringere Effektivität hinsichtlich der Förderung des Cholesterol-Efflux aus Astrozyten und Neuronen (Michikawa *et al.*, 2000). Es kann davon ausgegangen werden, dass Cholesterol selbst auch eine Rolle bei der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz spielt, da bei klinischen und epidemiologischen Studien festgestellt wurde, dass Patienten mit erhöhtem Plasma-Cholesterolspiegel eine erhöhte Prädisposition für AD vorweisen. Ebenso wurde erkannt, dass Statine die Prävalenz und Progression von AD verringern. Einige Studien deuten zudem darauf hin, dass die A β -Produktion durch Cholesterol reguliert wird. In Zellkultur-Modellen konnte gezeigt werden, dass Cholesterol den Effekt von A β auf Calcium-Signalwege sowie allgemein die Neurotoxizität reduziert (Cedazo-Mínguez, 2007). Es wird ersichtlich, dass die Interaktionen zwischen Cholesterol und A β sehr komplex sind. Da die Isoformen unterschiedlich kompetent bezüglich des Cholesterol-Transports sind, ist es wahrscheinlich, dass die Interaktionen zwischen Cholesterol und A β durch ApoE moduliert werden.

Die Wiederverteilung von Lipiden (Cholesterol) im Gehirn durch ApoE spielt eine wichtige Rolle bei Regeneration, Wachstum und synaptischer Plastizität. Dass das ApoE4-Protein an synaptischer Regeneration nur unzureichend beteiligt ist, kann daran erkannt werden, dass Träger des *APOE ϵ 4*-Allels neuronalen Verlust in verschiedenen Gehirnregionen zeigen, wohingegen Nicht-*APOE ϵ 4*-Träger zur Regeneration in diesen Arealen befähigt sind (Cedazo-Mínguez, 2007).

2.4.4 ApoE und cholinerge Dysfunktion

Ein typisches Symptom der Alzheimer-Demenz ist der Verlust der cholinergen Innervation von Cortex und Hippocampus. Neurone in diesen Arealen sind verantwortlich für Verarbeitung und Speicherung von Erinnerungen. Für diese Prozesse ist der Neurotransmitter Acetylcholin notwendig. Um den Verlust von Neuronen auszugleichen, erfolgt daher zu therapeutischen Zwecken die Gabe von Acetylcholinesterase-Inhibitoren. Diese inhibieren die

Spaltung von Acetylcholin und erhöhen somit dessen Konzentration im synaptischen Spalt. Es wurde jedoch beobachtet, dass *APOEε4*-Träger, wenn überhaupt, nur schlecht auf die Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren ansprechen. Dieser selektive pharmakogenetische Effekt dürfte darauf zurückzuführen sein, dass es bei *APOEε4*-Trägern zu einer sehr schnellen und schweren Schädigung des cholinergen Systems kommt. Dadurch ist eine Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren nur selten sinnvoll (Laws *et al.* 2003). Diese These wird durch die Tatsache bestätigt, dass Soininen *et al.* (1995) eine Reduktion der Aktivität der Cholinacetyltransferase mit einer Erhöhung der *APOEε4*-Kopienanzahl in Zusammenhang bringen konnten. Auch wurde beobachtet, dass die Zahl Acetylcholinesterase-positiver Zellen im Meynert-Basalkern (*Nucleus basalis*) und im diagonalen Band von Broca in Individuen, die den Genotyp *APOEε4/ε4* tragen im Vergleich zu Nicht-*APOEε4*-Trägern signifikant reduziert ist (Poirier, 1999).

2.4.5 ApoE und Neurotoxizität

Zu den Faktoren, die maßgeblich für die Neurotoxizität des ApoE-Proteins verantwortlich sind, gehören unter anderem Lipid-Bindung, proteolytische Spaltung und die Fibrillation.

In-Vitro-Versuche mit Neuronen zeigten, dass Lipid-freies, rekombinantes ApoE (E4 > E3) eine isoformabhängige Neurotoxizität besaß. Wurde hingegen ein mit Lipiden beladener ApoE-Lipoprotein-Komplex verwendet, konnten toxische Effekte verhindert werden (Cedazo-Mínguez *et al.*, 2001b). Ebenso konnte gezeigt werden, dass ApoE das Neuritenwachstum isoformabhängig fördert. In Versuchen mit ApoE3- bzw. ApoE4-exprimierenden Neuro-2a-Zellen förderte von der Zelle abgegebenes ApoE3 das Neuritenwachstum, während sich ApoE4 neutral verhielt. Weiterhin wurde festgestellt, dass das sezernierte ApoE in einer Lipid-armen Form vorlag und zur Wirkung kein exogenes Lipid zugeführt werden musste (DeMattos *et al.*, 1998). *In-Vivo*-Versuche mit transgenen ApoE-*Knock-out*-Mäusen, die humanes ApoE3, ApoE4 oder beide Proteine exprimierten, zeigten, dass Tiere mit der Kombination ApoE3/E3 gegenüber altersbedingter Neurodegeneration besser geschützt waren als Tiere mit der Kombination ApoE3/E4. Die Kombination ApoE4/E4 zeigte keinerlei Schutzwirkung (Buttini *et al.*, 2000).

Auch die proteolytische Spaltung des Proteins hat einen großen Einfluss auf die Neurotoxizität des ApoEs. Sowohl das C-terminal als auch das N-terminal verkürzte ApoE-Fragment wird in der Literatur als neurotoxisch beschrieben. Huang *et al.* (2001) berichten von einer Anhäufung der ApoE-Fragmente in Gehirnen von Alzheimer-Patienten im

Vergleich zu entsprechenden Kontrollgehirnen. Ebenso konnte eine Anhäufung von C-terminal verkürzten Fragmenten in neurofibrillären Bündeln beobachtet werden. Zusätzlich zeigte diese Arbeitsgruppe, dass dieses Fragment die Bildung NFT-ähnlicher Einschlussverbindungen in Neuronen induzierte. Insbesondere ein Fragment des ApoE4 (Aminosäuren 272-299) bewirkte eine Bildung der Einschlussverbindungen in bis zu 75 % der transfizierten Neuronen, wohingegen dies in Zellen nichtneuronalen Ursprungs nicht zu beobachten war. Weiterhin scheint ApoE4 gegenüber proteolytischer Spaltung anfälliger zu sein als die Isoform ApoE3. *In vivo* wurden bei transgenen Mäusen, die das C-terminal verkürzte Fragment exprimierten, Neurodegeneration und Verhaltensdefizite festgestellt (Harris *et al.*, 2003). Auch ein N-terminal verkürztes Fragment (Aminosäuren 1-199) wird als toxisch eingestuft. Der Mechanismus der Toxizität wird der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zugeschrieben (Tolar *et al.*, 1999).

Ein weiterer Toxizitätsfaktor ist die Fibrillation des ApoE-Proteins. Hatters *et al.* (2006) berichten über die Bildung löslicher fibrillärer ApoE-Aggregate *in vitro*. Die Fibrillation der Protein-Tetramere fand isoformabhängig ($E4 > E3 > E2$) statt. Ein Toxizitätstest in neuronaler Zellkultur zeigte eine erhöhte Toxizität der ApoE-Fibrillen gegenüber den Tetrameren. Ein Vorkommen der ApoE-Fibrillen konnte bisher *in vivo* jedoch noch nicht gezeigt werden.

2.4.6 Rolle der ApoE-Proteinexpression im Zusammenhang mit Alzheimer-Demenz

Das Risiko, an der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz zu erkranken, wird nicht nur mit dem Genotyp *APOEε4*, sondern auch mit einem erhöhten Plasmaspiegel des ApoE-Proteins in Verbindung gebracht. Taddei *et al.* (1997) berichteten von einer signifikant erhöhten ApoE-Plasmakonzentration sowohl bei Patienten mit *Early*- als auch mit *Late-Onset*-AD im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise stellte sich die Erhöhung als unabhängig vom Genotyp *APOEε4* heraus. Auch im frontalen Cortex von AD-Patienten konnten erhöhte ApoE-Spiegel festgestellt werden (Laws *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu stehen allerdings Untersuchungen, bei denen keine Erhöhung (Harr *et al.*, 1996) bzw. eine *APOEε4*-abhängige Erniedrigung des ApoE-Spiegels (Beffert *et al.*, 1999) bei Alzheimer-Demenz festgestellt wurden.

Da auch in neueren Studien eine induzierte Expression der *APOE*-mRNA im frontalen und temporalen Cortex und im Hippocampus gezeigt werden konnte, ist davon auszugehen, dass sowohl eine Erhöhung der Transkriptions- wie der Translationsrate mit der Manifestation der

Alzheimerschen Krankheit einhergehen. Es ist möglich, dass eine Kombination erhöhter ApoE-Level mit dem Genotyp *APOEε4* das Risiko für eine AD-Erkrankung synergistisch erhöht (Laws *et al.* 2003).

2.5 Der APOE-Promotor

Die Synthese von ApoE wird durch eine Interaktion verschiedener Faktoren wie Entwicklung, Hormone und Ernährung bestimmt. Es kommt zu einer Beeinflussung der Regulation bzw. Interaktion einer Vielzahl von Proteinen, die sowohl in der proximalen Promotorregion als auch an *Downstream*-Elementen (relativ zum Transkriptionsstart +1 gelegen) an der gewebsspezifischen Regulation des *APOE*-Gens beteiligt sind (Laws *et al.*, 2003). Der proximale Promotor des *APOE* befindet sich annäherungsweise in dem Bereich zwischen -1000 bp und +400 bp relativ zum Transkriptionsstart. In Abbildung 9 sind die im proximalen Promotor vorkommenden Elemente dargestellt:

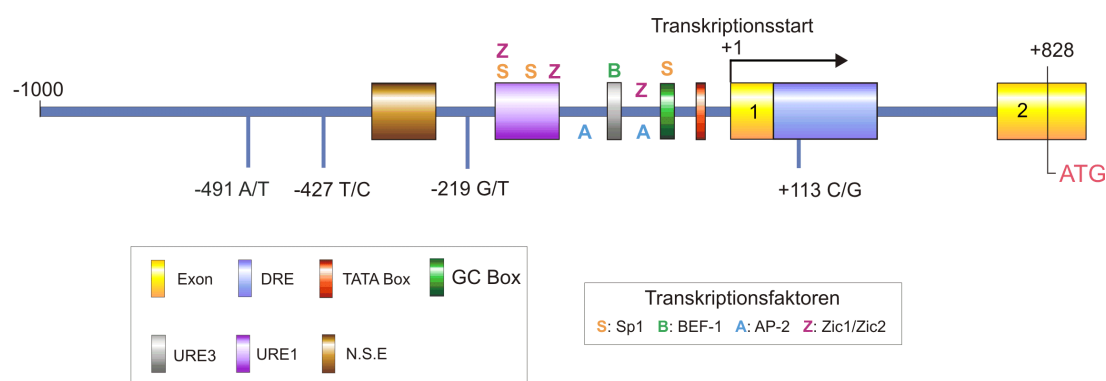


Abbildung 9: Schematische Darstellung der APOE-Promotorregion

Darstellung der proximalen Promotorregion (-1000 bp bis +828 bp) des humanen *APOE*-Gens. Neben den Elementen des Promotors und den Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren sind auch vier in der Literatur beschriebene Punktmutationen der Basensequenz eingezeichnet (modifiziert nach Laws *et al.*, 2003).

Diese befinden sich im Bereich von -360 bp bis -80 bp sowie innerhalb des ersten Introns. Die Region beinhaltet ein nicht-spezifisches *Enhancer*-Element (N.S.E) von -366 bis -246, zwei *upstream regulatory elements* (URE), URE1 und URE3, von -193 bis -124 und -101 bis -89, eine GC Box im Bereich zwischen -59 bis -49 und eine TATA-Box. Das *downstream regulatory element* (DRE) ist im Bereich +44 bis +262 lokalisiert (Laws *et al.*, 2003). Das innerhalb des URE1 zu findende *positive element for transcription* (PET) kann als *Enhancer*-

Element agieren. Die Aktivität des PET wird durch den Transkriptionsfaktor Sp1 gesteuert. Weitere Bindungsstellen für Sp1 konnten im URE1 und in der GC-Box identifiziert werden. Es wird vermutet, dass Sp1 eine wichtige Rolle für sowohl die basale Expression als auch die *Enhancer*-Aktivität des Promotors spielt (Chang *et al.*, 1990). Für den Transkriptionsfaktor BEF-1 (*BK virus enhancer factor 1*) konnte im URE3 eine Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle identifiziert werden. Untersuchungen in HepG2-Zellen belegten einen negativen Effekt von BEF-1 auf die Regulation des *APOE*-Gens (Berg *et al.*, 1995). Für die Zinkfinger-Proteine Zic1 und Zic2 existieren drei Bindungsstellen innerhalb des proximalen Promotors. Studien in U87-MG-Zellen (Luciferase-Reportergen-Assay, ektopische Expression von Zic1 und Zic2) deuteten an, dass die Zic-Proteine die Transkription des *APOE*-Gens beeinflussen und zu einer trans-Aktivierung beitragen (Salero *et al.*, 2001). Ebenso kann eine Regulation des proximalen Promotors durch den Transkriptionsfaktor AP-2 erfolgen, welcher schnell und nachhaltig durch cAMP induziert werden kann. Dies konnte durch erhöhte Promotoraktivität in einem Reportergen-Assay in U87-MG-Zellen gezeigt werden (García *et al.*, 1996). Aufgrund der dargestellten vielfältigen Einflussfaktoren auf den *APOE*-Promotor erscheint der Mechanismus der Regulation der *APOE*-Transkription sehr komplex.

2.5.1 Promotorpolymorphismen

Bis heute konnten in der Sequenz des *APOE*-Promotors einige Polymorphismen identifiziert werden. Dazu gehören die A/T-Transversion an Position -491, die T/C-Transition an Position -427, die G/T-Transversion an Position -219 und die C/G-Transversion an Position +113, die auch als IE1 bezeichnet wird, da sie im *Enhancer*-Element des ersten Introns zu finden ist (Artiga *et al.*, 1998a). Der SNP (*single nucleotide polymorphism*) an Position -219 wird aufgrund seiner Lokalisation in einer potentiellen Th1/E47-Bindungsstelle auch als Th1/E47cs-Polymorphismus bezeichnet (Lambert *et al.*, 1998a). Der Einfluss der Polymorphismen auf die Promotoraktivität wurde von Artiga *et al.* (1998a) mittels eines Luciferase-Reportergen-Assays in HepG2-Zellen untersucht. Als Kontrolle diente der „Wildtyp“-Haplotyp -491A, -427T und -219T. Ein Austausch von A zu T an Position -491 resultierte in einer Repression der Promotoraktivität auf 63 %, wohingegen ein Austausch von T zu G an Position -219 eine Induktion auf 169 % herbeiführte. Ein Tausch von T zu C an Position -427 brachte keinerlei Veränderung mit sich. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch EMSA-Untersuchungen (*electrophoretic mobility shift assay*), die Unterschiede in der

Proteinbindung der Polymorphismen -491 und -219 zeigten. Auch hier war analog zum Reporter-gen-Assay kein Unterschied zwischen den Polymorphismen der Position -427 zu erkennen.

2.5.2 Promotorpolymorphismen im Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz

Das Risiko für eine AD-Erkrankung kann durch Faktoren beeinflusst werden, die die Regulation des *APOE*-Gens steuern. Da sich die vier vorkommenden Promotorpolymorphismen (-491A/T, -427T/C, -219T/G und +113G/C) in der Aktivität des Promotors unterscheiden (vgl. Artiga *et al.*, 1998a), wurden sie hinsichtlich ihres Einflusses auf das Erkrankungsrisiko untersucht. Die durchgeführten Studien führten jedoch zu teilweise kontroversen Ergebnissen, die im Folgenden dargestellt sind.

Promotorpolymorphismus -491A/T

Der SNP an Position -491A/T ist der am besten untersuchte Polymorphismus des *APOE*-Promotors. Ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp -491A/A und dem Risiko an Alzheimer-Demenz zu erkranken wurde erstmals von Bullido *et al.* (1998) aufgezeigt. Eine Analyse zweier unabhängiger Populationen (spanisch und nordamerikanisch) konnte zeigen, dass eine Homozygotie des -491A-Allels mit einem erhöhten Risiko für AD assoziiert werden kann, und dass dies unabhängig vom *APOEε4*-Status ist. Diese Ergebnisse konnten *in vitro* (HepG2-Zellen) bestätigt werden. Eine Untersuchung der Transkriptionsaktivität (Luciferase-/β-Galactosidase-Assay) der beiden Promotorvarianten -491A und -491T zeigte eine niedrigere konstitutive Promotoraktivität des -491T-Konstrukts. Ebenso waren in EMSA-Untersuchungen Unterschiede der beiden Promotorvarianten hinsichtlich der Bindung von Kernproteinen zu beobachten. Bullido *et al.* (1998) schlussfolgerten, dass der Polymorphismus im Promotor des *APOE*-Gens das Risiko für eine AD-Manifestation durch Modulation der *APOE*-Transkription beeinflusst, insbesondere bei Individuen ohne *APOEε4*-Allel.

Des Weiteren wurden verschiedene klinische und *Post-Mortem*-Studien durchgeführt, die einen Zusammenhang des -491A-Allels mit der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz herstellen bzw. einen protektiven Effekt des Genotyps -491T/T aufzeigen konnten. Jedoch gibt es auch mehrere Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dem -491A-Allel und der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz sehen. Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte ein Gametenphasenungleichgewicht (*linkage*

disequilibrium) zwischen dem SNP an Position -491 und dem *APOEε4*-Allel sein, welches von Population zu Population unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Weiterhin unterscheiden sich die Populationen stark in der Frequenz des -491A/A Genotyps, was auch zu einer fehlenden Verknüpfung des Polymorphismus mit der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz in Studien führen kann. Dennoch konnten nachfolgende Studien belegen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp -491A/A und Alzheimer-Demenz bei Individuen ohne *APOEε4*-Allel erhalten blieb, obgleich anderenfalls der Zusammenhang zwischen -491 und AD teilweise auf das Gametenphasenungleichgewicht von -491 und *APOEε4* zurückgeführt werden kann (Laws *et al.*, 2003).

Promotorpolymorphismus -427T/C

Untersuchungen des SNP an Position -427 führten zu kontroversen Ergebnissen. Nur zwei von fünf durchgeführten Studien gaben Hinweise auf eine unabhängige Korrelation des -427C-Allels und der Alzheimer-Demenz. Drei weitere Studien konnten dies nicht bestätigen (Laws *et al.*, 2003). Dennoch konnten Artiga *et al.* (1998b) durch eine Fall-Kontroll-Studie den verbreiteten Haplotyp -491A/-427C mit einem erhöhtem AD-Risiko in Verbindung bringen.

Promotorpolymorphismus -219T/G (TH1/E47cs)

Lambert *et al.* (1998b) stellten eine Studie vor, in welcher der Promotorpolymorphismus -219T mit einer Erhöhung des Risikos für die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz *APOE*-Allel-unabhängig in Verbindung gebracht werden konnte. Neben zwei weiteren Studien, die ähnliche Ergebnisse zeigten, existieren aber auch Studien einer nordamerikanischen und einer australischen Population, die diesen Zusammenhang nicht herstellen konnten. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte in diesem Fall durch ein beobachtetes Gametenphasenungleichgewicht zwischen dem -219T- und dem *APOEε4*-Allel erklärt werden (Laws *et al.*, 2003).

Promotorpolymorphismus +113G/C (IE1)

Ein Gametenphasenungleichgewicht zeichnet sich auch zwischen dem SNP an Position +113 und dem *APOEε4*-Allel ab. Zwei von vier Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Verknüpfung des Polymorphismus +113C mit der Alzheimer-Demenz gänzlich auf das *APOEε4*-Allel zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu stehen allerdings zwei Untersuchungen, die auch nach Kontrolle des *APOEε4*-Allels den Zusammenhang SNP +113C und AD als signifikant einstufen (Laws *et al.*, 2003). Somit ist es zum jetzigen

Zeitpunkt nicht möglich, eine Aussage bezüglich des Promotorpolymorphismus +113G/C hinsichtlich einer Beeinflussung des Risikos für eine AD-Erkrankung zu treffen.

3 *Tabernaemontana pandacaqui* LAM

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der Suche nach *APOE*-mRNA-modulierenden und somit potentiell neuroprotektiven Substanzen auch Extrakte der Pflanze *Tabernaemontana pandacaqui* LAM. auf Aktivität am *APOE*-Promotor geprüft. Da sowohl in einem Reporter-gen-Assay als auch bei einer Genexpressionsanalyse mittels *Real-Time*-RT-PCR eine mRNA-modulierende Aktivität gezeigt werden konnte, wurde der methanolische Extrakt dieser Pflanze zu einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung herangezogen (siehe Kapitel 20). Die Pflanze soll im Folgenden kurz vorgestellt werden.

3.1 Systematik und Botanik

Tabernaemontana pandacaqui LAM. ist ein Busch mit einer Höhe von 1-14 m. Die gegenständigen gestielten Blätter sind elliptisch bis lanzettenförmig, 5-10 cm lang und 2-5 cm breit. Die axillar stehenden Blütenstände tragen weiße, duftende Blüten mit einer Corolla bestehend aus fünf Kronlappen und einem Durchmesser von 0,8-2,2 mm. Nach der Blütezeit von Mai bis Juli,

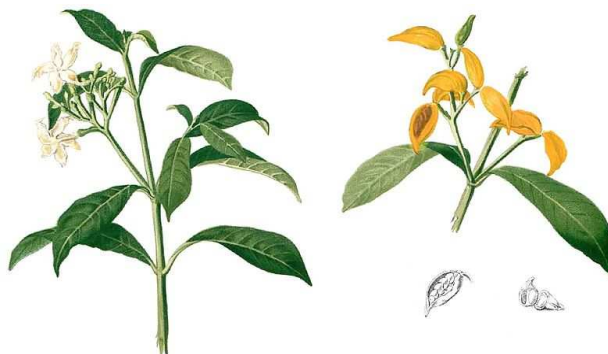


Abbildung 10:
Tabernaemontana pandacaqui LAM.
(Apocynaceae)

aus Blanco (1880-1883): Flora de Filipinas [...] Gran edicion [...] [Atlas I].

reifen bis zu 3 cm lange, gelbe elliptische Balgfrüchte heran. Milchiger Latex ist in allen Pflanzenteilen zu finden. Die Verbreitung der Art erstreckt sich über Indonesien, Malaysia, die Philippinen, Thailand, Australien und die Pazifischen Inseln (*Flora of China*, Internetquelle 5). Für die Art sind unter anderem die Synonyme *Tabernaemontana laurifolia* Blanco non L., *Tabernaemontana semperflorens* Perr. und *Ervatamia pandacaqui* (Poir) Pichon gebräuchlich (van Beek *et al.*, 1984).

Innerhalb der Familie der Hundsgiftgewächse können sie der Unterfamilie Rauvolfioideae und dem Tribus Tabernaemontaneae zugeordnet werden (Pratchayasakul *et al.*, 2008). Der Gattungsname *Tabernaemontana* geht auf den deutschen Mediziner und Botaniker Jakob Theodor (* 1522 in Bergzabern, † 1590 in Heidelberg) zurück. Er latinisierte seinen Geburtsort Bergzabern in Tabernaemontanus und veröffentlichte unter diesem Namen unter anderem 1588 das „New Kreuterbuch“, weswegen er als einer der bedeutendsten Botaniker des 16. Jahrhunderts gilt. Charles Plumier benannte 1703 in seinem „*Nova Plantarum Americanarum Genera*“ ihm zu Ehren die Gattung als *Tabernaemontana*. Diese Bezeichnung wurde später von Carl von Linné übernommen (Mägdefrau, 1992).

3.2 Inhaltsstoffe

Innerhalb der Gattung *Tabernaemontana* sind hauptsächlich Alkaloide und nur gelegentlich andere wichtige sekundäre Pflanzenstoffe anzutreffen. Die Gattungen der Unterfamilie Plumeroideae enthalten Indolalkaloide. Für *T. pandacacui* sind Alkaloide vom Corynanthean-, Strychnan-, Aspidospermatan-, Tacaman- und Ibogan-Typ sowie Bis-Indole beschrieben (van Beek *et al.*, 1984). Taesotikul *et al.* (1990) führen Coronaridin und 19S-Heyneanin als Hauptkomponenten der Alkaloidfraktion an (Abbildung 11). Beide Alkaloide können dem Ibogan-Typ zugeordnet werden.

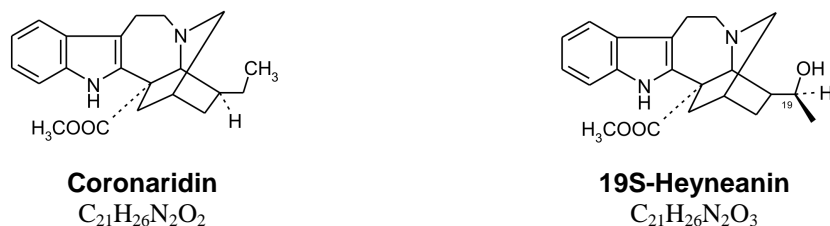


Abbildung 11: Hauptkomponenten der Alkaloidfraktion aus *T. pandacacui*.

3.3 Traditionelle Anwendung

Die Gattung *Tabernaemontana* wird sowohl in der Traditionellen Chinesischen und Thailändischen Medizin als auch in der Ayurvedischen Medizin als Heilmittel verwendet. Sie wird allgemein gegen Fieber, Schmerz und Diarrhöe eingesetzt (Pratchayasakul *et al.*, 2008).

Anwendungsgebiete auf den Philippinen

Für die meisten Anwendungsgebiete werden Blätter verwendet. Dekokte werden gegen Durchfall und bei Schlangenbissen eingesetzt. Es wird ebenso berichtet, dass Frauen einen Dekokt nach der Geburt ihrem Badewasser zusetzen. Die Applikation eines Kataplasmas auf dem Bauch dient der Einleitung der Menstruation bzw. der Beschleunigung der Geburt. Die Blätter werden außerdem zur Behandlung eines Rückfalls „jeglicher Krankheiten“ und zur Heilung plötzlicher Krämpfe und Bauchschmerzen eingesetzt. Weiterhin finden sie als Bleichmittel Verwendung. Der milchige Saft (Latex) wird direkt auf betroffene Stellen aufgebracht, um Schwellungen zu reduzieren und die Wundheilung zu fördern. Ein Dekokt der Rinde und der Wurzeln wird zum einen zur Therapie von Beschwerden im Bauchraum wie z.B. Gastroenteritis und zum anderen während der Geburt eingesetzt (van Beek *et al.*, 1984).

Anwendungsgebiete im Inselstaat Vanuatu

Im Inselstaat Vanuatu werden zur Behandlung von Hautkrebs eine Hand voll Blätter in einer Tasse Wasser ausgepresst und diese Lösung zweimal täglich eingenommen. Besteht der Wunsch, ein Mädchen zur Welt zu bringen, so wird ein einmaliges Kauen eines Zweiges im ersten Schwangerschaftsmonat empfohlen. Wunden und Centipeden-Bisse werden mit dem milchigen Latex behandelt. Zur Therapie der Tuberkulose wird eine Tasse Emulsion aus etwas Latex mit Wasser einen Monat lang eingenommen (Bradacs, 2008b).

3.4 Wissenschaftliche Datenlage der Wirkungen

1989 führten Taesotikul *et al.* einen hippokratischen Screening-Test an Ratten mit ethanolischen Extrakten aus Wurzel, Stamm, Blättern und Blüten von *T. pandacaqui* durch. Diese Tests werden üblicherweise zur Entdeckung interessanter pharmakologischer Aktivitäten von Pflanzenextrakten durchgeführt. In diesem Fall verursachten die Extrakte aller Pflanzenteile eine Sedierung, verringerte Atmung und einen verminderten Muskeltonus. Die Autoren nannten ZNS-Dämpfung, Analgesie, Muskelrelaxation und periphere Vasodilatation als interessante Aktivitäten, die es weiterführend zu erforschen gilt (Taesotikul *et al.*, 1989).

Der Effekt der Alkaloidfraktion (*crude alkaloidal fraction*, CA) aus der Sprossachse auf Blutdruck und Herzfrequenz von Ratten wurde 1998 von derselben Arbeitsgruppe (Taesotikul *et al.*, 1998a) untersucht. Dazu wurden sowohl anästhesierte Ratten (Pentobarbital) als auch Ratten bei Bewusstsein eingesetzt. In beiden Modellen kam es zu einer hypotensiven

Aktivität der CA-Fraktion. Bei den anästhesierten Tieren konnten bei intravenöser Applikation nacheinander folgend zwei hypotensive und bradykarde Reaktionen beobachtet werden, wobei nur die zweite Reaktion dosisabhängig und verlängert verlief. Um den Wirkmechanismus der CA-Fraktion näher erforschen zu können, wurden noch weitere Tests mit unterschiedlich anästhesierten Ratten durchgeführt, die zusätzlich noch mit Atropin bzw. Chlorpheniramin behandelt wurden. Die Ergebnisse legten die Schlussfolgerung nahe, dass in der ersten Phase der Reaktion cholinerge und zentrale Mechanismen eine Rolle spielen, und die zweite Phase eher durch Mechanismen bestimmt wird, die durch biogene Amine, Acetylcholin, Histamin oder über zentrale Stimulation ausgelöst werden.

Die CA-Fraktion (aus der Sprossachse der Pflanze) wurde ebenso in Ratten und Mäusen auf ihre Aktivität im ZNS untersucht. Nach intraperitonealer Injektion wurden ZNS-dämpfende Symptome bei den Tieren beobachtet. Es kam zur Reduktion der spontanen Beweglichkeit der Tiere, zur Potenzierung der Phenobarbital-Schlafzeit, zu Antinozizeption und zur Verlängerung der Latenz von Krämpfen die durch Pentylenetetrazol ausgelöst wurden. Die CA-Fraktion konnte einen Oxotremorin-induzierten Tremor nicht antagonisieren, aber den durch Oxotremorin ausgelösten Speichelfluss unterbinden. Da Oxotremorin sowohl zentral (Tremor) als auch peripher (vermehrter Speichelfluss) cholinomimetisch wirkt, ließen die Ergebnisse den Rückschluss zu, dass die CA-Fraktion nicht in zentral cholinerge Mechanismen eingreift, peripher aber eine muskarinische Blockade-ähnliche Wirkung zeigt (Taesotikul *et al.*, 1998b).

Des Weiteren wurden sowohl der ethanolische Extrakt der Sprossachse als auch die CA-Fraktion auf anti-inflammatorische, antipyretische und antinozizeptive Wirkungen in Maus- und Rattenmodellen untersucht (Taesotikul *et al.*, 2003). Alle drei Wirkungen konnten im Tierversuch nachgewiesen und auf die im Extrakt enthaltenen Alkaloide zurückgeführt werden.

4 Zielstellung der Arbeit

Die intensive Forschung auf dem Gebiet der Alzheimer-Demenz konnte bislang einige genetische Risikofaktoren aufzeigen, die Einfluss auf die Pathogenese der Krankheit nehmen. So konnten Mutationen der Gene *Präsenilin 1*, *Präsenilin 2* und des *APP*-Gens als Ursachen für den Ausbruch der autosomal dominanten, familiären Form der Alzheimer-Demenz identifiziert werden.

Als Risikofaktor für die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit wurde die genetische Variante *APOEε4* des *APOE*-Allels identifiziert. Neben dieser Allel-Variante scheinen aber auch die Expression bzw. der Plasmaspiegel des Proteins selbst einen Einfluss auf die Krankheit zu nehmen. Taddei *et al.* (1997) konnten Genotyp-unabhängige, erhöhte Plasmaspiegel des ApoE-Proteins sowohl bei der Alzheimer-Demenz mit frühem als auch mit spätem Beginn im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Im frontalen und temporalen Cortex konnte auch in neueren Studien eine erhöhte *APOE*-Expression gezeigt werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sowohl eine Erhöhung der Expression auf RNA-Ebene, als auch eine Erhöhung des Protein-Levels mit einer AD-Erkrankung einhergeht (Laws *et al.* 2003).

Cedazo-Mínguez (2007) stellten zwei mögliche Ansätze einer ApoE-basierenden AD-Therapie vor, die mit der Expression des Proteins in Zusammenhang stehen: die Senkung des ApoE-Spiegels, insbesondere wenn ein *APOEε4*-Allel vorliegt, um so ApoE-bedingte Toxizität zu vermeiden, und andererseits eine Erhöhung des ApoE-Spiegels, um protektive Eigenschaften des ApoE3 bzw. ApoE2 zu verstärken.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen war es Ziel der vorliegenden Arbeit, einen Reportergen-Assay zu entwickeln, der es ermöglicht, auf Transkriptionsebene eine Suche nach *APOE*-modulierenden, und somit potenziell neuroprotektiven Substanzen durchzuführen. Im Vordergrund stand die Entwicklung eines Reportergen-Assays, der valide Vorhersagen bezüglich *APOE*-mRNA-modulierender Aktivitäten von Reinsubstanzen und Extrakten verschiedener Pflanzen erlauben sollte. Die in dem Reportergen-Assay gewonnenen Ergebnisse sollten die Regulation des endogenen *APOE*-Gens in Zellen der Zellkultur widerspiegeln und somit eine Vorhersage für eine auch therapeutisch interessante Modulation der *APOE*-Transkription ermöglichen.

Weiterhin sollte mit Hilfe des Reportergen-Assays eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung eines als aktiv erkannten Extrakts durchgeführt werden, um neue Wirkprinzipien in Pflanzenextrakten zu identifizieren.

Materialien und Methoden

5 Materialien

5.1 Laborgeräte

Analysenwaagen:	A 210 P, BP 210 P und MC 210 P (Sartorius, Göttingen)
ASE – Hochdruckflüssig-extraktionsapparatur:	ASE 100 Accelerated Solvent Extractor (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
CO ₂ -Inkubator:	CO ₂ Single Chamber Water Jacketed Incubator, Model 3110 (Forma Scientific, Marietta, OH, USA)
Dampfsterilisator (Autoklav):	Varioklav Dampfsterilisator (H + P Labortechnik, Oberschleißheim)
DC-Auftragegerät:	AS 30 TLC Applicator, Software: AS30WIN, Version 1.8.00 (Desaga, Heidelberg)
DC-Imager:	Kamera: CabUVis, Software: DESAGA ProViDoc, Version 4 (Desaga, Heidelberg)
Elektroporator:	Gene Pulser Xcell mit ShockPod (BioRad, Hercules, CA, USA)
Gefriertrocknungsanlage:	Freezemobile (Virtis, Gardiner, NY, USA) Alpha 2-4 (Christ, Osterode) ILMVAC PIA 100 (ILMVAC GmbH, Ilmenau)
Geldokumentation:	Gel Jet Imager 2004 (Intas, Göttingen)
HPLC-Anlage	Varian Prostar, 335 LC Detector, Pumpen (Solvent Delivery Module) Model 210 Software: Galaxie Chromatography Data System, Version 1.9.302.530 (Varian, Darmstadt)
Mikroskope:	Binokular-Mikroskop Standard KF2 (Carl Zeiss, Jena) Inverses Mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss, Jena) Inverses Mikroskop CKX 41 (Olympus, Hamburg)
MTP-Reader:	FLUOStar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg) SpectraFluor Plus (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz)

PCR-Gerät:	T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) Primus 96 advanced (Peqlab, Erlangen)
pH-Wert-Messgerät	pH-Meter pH 526 MultiCal® (WTW, Weilheim)
<i>Real-Time</i> -PCR-System:	Mx3000P (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
Sterile Werkbank (LAF):	HeraSafe KS15 (Kendro, Langenselbold)
UV/VIS-Spektrometer:	BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
Waagen:	E2000D, BA 6100 und PT 310 (Sartorius, Göttingen)
Wasseraufbereitung:	Seradest SD 2800 (SERAL Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach) Serapur Delta (SERAL Reinstwassersysteme, Ransbach-Baumbach)
Zählkammer:	Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe)
Zentrifugalevaporator:	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifugalmühle:	ZM 1 und ZM100 (Retsch, Haan)
Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburg) Biofuge Pico (Heraeus, Osterode) Labofuge 400R (Heraeus, Osterode) Multifuge 1 L-R (Heraeus, Osterode) Megafuge 1.0R (Heraeus, Osterode)

5.2 Verbrauchsmaterialien

Filter Minisart RC 25, Porengröße 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
MTP 6well, PS, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
MTP 24well, PS, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
MTP 96well, PS, F-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
MTP 96well, PS, LUMITRAC® 200, F-Form (für Lumineszenz-Messung)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml und 2,0 ml)	Brand, Wertheim Greiner Bio-One, Frickenhausen Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße für Real-Time-PCR,

96well PP-Platten

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Reaktionsgefäßverschluß für Real-Time-PCR

(8fach – Streifen)

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Rotilabo[®] Spritzenfilter, steril, PES

(Porengröße 0,22 µm)

Roth, Karlsruhe

Sterile Einfrierröhrchen Cryo.sTM (2 ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterile Einmalpipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml)

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterile Einmalskalpelle

Aesculap, Tuttlingen

Sterile Einmalspritzen (2, 5, 10 und 20 ml)

Braun, Melsungen

Sterile Injektionskanülen (20G, 23G, 27G)

Braun, Melsungen

UV-Küvette mikro

Brand GmbH, Wertheim

Zellkulturflaschen, PS, 25 cm²

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Zellkulturflaschen, PS, 75 cm²

Greiner Bio-One, Frickenhausen

5.3 Stationäre Phasen

Kieselgel Geduran Si 60 (0,063-0,2 mm)

Merck, Darmstadt

Sephadex[®] LH-20

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dünnschichtchromatographie

Kieselgel 60 F₂₅₄

DC-Aluminiumfolien, Merck, Darmstadt

Kieselgel RP-60 F₂₅₄

DC-Aluminiumfolien, Merck, Darmstadt

Semipreparative HPLC-Säule

Eurospher 100-7 C18

Durchmesser 16 mm, Länge 250 mm

Knauer, Berlin

5.4 Lösungsmittel und Gase

Alle verwendeten Lösungsmittel für chemische und analytische Verfahren sowie Extraktionen entsprachen mindestens der p.a.-Qualität und wurden von Roth (Karlsruhe) sowie Merck (Darmstadt) oder Laborchemie (Apolda) bezogen. Für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden Lösungsmittel in entsprechender Reinheit verwendet. Für NMR-Untersuchungen wurden die Substanzen in Chloroform-d₁ (99,8%) und Methanol-d₄ (99,8%)

der Firma Deutero GmbH (Deutero GmbH, Kastellaun) gelöst. Lösungsmittel, Chemikalien und Reagenzien der biologischen Assays sowie molekularbiologischen Analyseverfahren waren für biochemische Zwecke geeignete Materialien höchster Reinheit. Wasser entsprechender Reinheit wurde mit Hilfe der angegebenen Wasseraufbereitungsanlagen gewonnen.

Die verwendeten Gase (Kohlendioxid und Stickstoff) mit Qualität für technische Zwecke wurden von Linde (Wiesbaden) bezogen.

5.5 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose Broad Range Roti®garose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto-Trypton	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Cryo-SFM (Einfriermedium)	PromoCell, Heidelberg
Dibutyl-cAMP, Natriumsalz	Biotrend, Wangen, Schweiz
	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM , ohne Phenolrotzusatz, ohne	
Natriumpyruvat, mit stabilem Glutamin	
(Gibco™)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM, mit Phenolrotzusatz, 4,5 g/l Glucose,	
mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching,
	Österreich
DMSO	Roth, Karlsruhe
	Fluka, Buchs, Schweiz
DNA-Größenstandards:	
pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II), Marker 23	Fermentas, St.Leon-Rot
O'GeneRuler™ 50bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot
Lambda DNA/ <i>Pst</i> I Digest	Fermentas, St.Leon-Rot
dNTP-Mix (2mM, 25mM)	Roth, Karlsruhe

EDTA	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1 %	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS), Ch.: CSJ 0417, RSJ 30856	HyClone UK Ltd, Cramlington, UK
Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Hygromycin-B-Lösung (50 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
MTT (Thiazolylblau)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS-Lösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 E / 10000 µg/ml) (P/S)	Biochrom, Berlin
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Biotrend, Wangen, Schweiz
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %) in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	Biochrom, Berlin

5.6 Kits

Alle Kits wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

<i>DNeasy® Plant Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>DNeasy® Tissue Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Qiaquick® Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy® mini Kit</i>	Qiagen, Hilden

<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen, Hilden
<i>Bright-GloTM Luciferase Assay System</i>	Promega, Mannheim
<i>Dual-GloTM Luciferase Assay System</i>	Promega, Mannheim
<i>Brilliant[®] II SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix Kit</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>Brilliant[®] SYBR[®] Green QPCR Master Mix Kit</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
<i>DreamFectTM</i>	OZ Biosciences, Marseille, Frankreich
Triple Master Mix	Eppendorf, Hamburg

5.7 Primer

Die verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Martinsried), Biomers.net (Ulm) und Metabion (Martinsried) bezogen. Die gefriergetrockneten Oligonukleotide wurden mit entsprechenden Volumina Wasser zu einer Stammkonzentration von 100 µM gelöst. Von der Firma Metabion bezogene Primer wurden bereits in der angegebenen Konzentration in Wasser gelöst geliefert. Die Sequenzen der Primer sind in 5' → 3'-Richtung dargestellt.

5.7.1 Primer für *Real-Time-PCR*

		Produktgröße
<i>Apolipoprotein E (APOE):</i>		
ApoE-RT-5-4	GGT CGC TTT TGG GAT TAC CT	150 bp
ApoE-RT-3-3	TTC CTC CAG TTC CGA TTT GT	
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH):</i>		
GAPDH_for	ACC AGG TGG TCT CCT CTG AC	173 bp
GAPDH_rev	TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT	
<i>Luciferase (Photinus pyralis)</i>		
Luci-RT-for	GCT CAG CAA GGA GGT AGG TG	188 bp
Luci-RT-rev	TCT TAC CGG TGT CCA AGT CC	

Luciferase (Renilla reniformis)

193 bp

Renilla-RT-for	ATG GGA TGA ATG GCC TGA TA
Renilla-RT-rev	TGT TGG ACG AAC AAC TTC AC

Genotypisierung APOE

ApoE4-rt-5-1	GGA CAT GGA GGA CGT GC	170 bp
ApoE4-rt-3-1	GGT ACA CTG CCA GGC G	
ApoE3-rt-5-1	GGA CAT GGA GGA CGT GT	
ApoE2-rt-3-1	GGT ACA CTG CCA GGC A	
Genotyp.ApoE.for	GCT GAT GGA CGA GAC CAT GAA G	468 bp
Genotyp.ApoE.rev	TCC GGC TGC CCA TCT CCT C	

5.7.2 Primer für die Klonierung der APOE-Promotorregion

Produktgröße

5'-regulatorische Region (-1011 bis +400)

1444 bp

betagalforw1	GCT AAG CTT CAA GGT CAC ACA GCT GGC AAC T
betagalrev1	GCT AAG CTT TCC AAT CGA CGG CTA GCT ACC

APOE-Promotorregion (-1000 bis +828)

1844 bp

Promotor.ApoE.for	GCT CGA GAA CTG GCA GAG CCA GGA TTC AC
Promotor.ApoE.rev	GCT AAG CTT CTT CCT GCC TGT GAT TGG C

5.7.3 Primer für Doppelstrangmutagenesen und Sequenzierungen

Doppelstrangmutagenesen

ApoEMut_T-491A.for	GGC CAG GCT CTC AAA CTC CTG ACC TTA AGT GAT TCG
ApoEMut_T-491A.rev	CGA ATC ACT TAA GGT CAG GAG TTT GAG ACC AGC CTG GCC
ApoE-491Ascreen.rev	CAC TTA AGG TCA GGA GT
ApoEMut_G-219T.for	GGA TGG AGG AGG GTG TCT GTA TTA CTG GGC GAG GTG TCC TC
ApoEMut_G-219T.rev	GAG GAC ACC TCG CCC AGT AAT ACA GAC ACC CTC CTC CAT TC

ApoE-219Tscreen2.for GGA GGG TGT CTG T

Sequenzierungen

Promotor.ApoE.mitte	GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT A
Genotyp.ApoE.for	GCT GAT GGA CGA GAC CAT GAA G
Genotyp.ApoE.rev	TCC GGC TGC CCA TCT CCT C

5.7.4 Primer zur Sequenzanalyse der ITS-Region

		Produktgröße
Ker010-F	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	681 bp
Ker012-R	CTG ACC TGG GGT CGC	

5.8 Vektoren

5.8.1 Kommerzielle Ausgangsvektoren

pGL4.14[luc2/Hygro] (25013)	Reportergen-Vektor für Säugerzellen (5841 bp), luc2, Amp ^r , Hyg ^r (Promega, Mannheim)
pRL-TK (25041)	Kontroll-Reporter-Vektor für Säugerzellen (4045 bp), Rluc, Amp ^r , HSV-TK-Promotor (Promega, Mannheim)
pOTB7ApoE3 (25002)	Clone ID: IRAUp969B0212D6 (RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin)
	Klonierungsvektor für <i>E.coli</i> (1815 bp), Insert: APOEε3, Cm ^r , T7-Promotor, SP6-Promotor (RZPD, Berlin)
pGEM [®] -T	Klonierungsvektor für <i>E.coli</i> (3001 bp), Amp ^r , f1-ori, T7-Promotor, SP6-Promotor, lacZ (Promega, Mannheim)

5.8.2 Hergestellte Vektorkonstrukte mit Insert

pGL4.14-25027	<i>APOE</i> -Promotor-Sequenz (-1000 bis +828) als PCR-Produkt (Primer: Promotor.ApoE.for, Promotor.ApoE.rev) als <i>XhoI/HindIII</i> -Fragment in Ausgangsvektor pGL4.14[luc2/Hygro] kloniert
pGL4.14-25037	5'-regulatorische Region <i>APOE</i> (-1011 bis +400) als PCR-Produkt (Primer: betagalforw1, betagalrew1) als <i>HindIII</i> -Fragment in Ausgangsvektor pGL4.14[luc2/Hygro] kloniert
pGL4.14-25038	Doppelstrangmutagenese an pGL4.14-25037 (Primer: ApoEMut_T-491A.for, ApoEMut_T-491A.rev) Einführung der Punktmutation -491 T zu A
pGL4.14-25039	Doppelstrangmutagenese an pGL4.14-25037 (Primer: ApoEMut_G-219T.for, ApoEMut_G-219T.rev) Einführung der Punktmutation -219 G zu T
pGL4.14-25040	Doppelstrangmutagenese an pGL4.14-25038 (Primer: ApoEMut_G-219T.for, ApoEMut_G-219T.rev) Einführung der Punktmutation -219 G zu T

5.9 Enzyme

GoTaq® (5 U/μl)	Promega, Mannheim
Proteinase K (900 U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/μl)	Fermentas, St.Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
RNase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	5 PRIME GmbH, Hamburg
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St.Leon-Rot

5.10 Puffer und Lösungsmittelgemische

10× DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,1	% (w/v)
	Xylencyanol	0,1	% (w/v)
	EDTA	0,2	M
	Glycerin	50	% (w/v)
Salzlösung	1 M MgCl ₂	1	ml
	1 M MgSO ₄	1	ml
	NaCl	0,5	g
	vollentsalztes Wasser ad.	30	ml
10× TBE-Puffer	Tris	1	M
	EDTA	20	mM
	H ₃ BO ₃	0,5	M
Proteinase K-Puffer pH 7,4	Tris	10	mM
	EDTA	25	mM
	NaCl	75	mM
1× TE-Puffer pH 8,0	Tris/HCl	10	mM
	EDTA	1	mM
1× low-TE-Puffer pH 8,0	Tris/HCl	10	mM
	EDTA	0,1	mM

5.11 Nährmedien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Folgende Medien wurden zur Anzucht von *E.coli* verwendet. Fand eine Selektion mit Ampicillin statt, so wurde dieses in einer Konzentration von 100 µg/ml dem LB-Medium zugesetzt.

LB-Medium	Bacto-Trypton	10	g/l
	Hefe-Extrakt	5	g/l
	NaCl	5	g/l
			autoklavieren
SOC-Medium	Bacto-Trypton	20	g/l
	Hefe-Extrakt	5	g/l
	Glucose	0,1	(m/v)
LB-Agar	Agar Agar	20	g/l
	in flüssigem LB-Medium		autoklavieren

5.12 Medien für die humane Zellkultur

Normalmedium (1321N1)	DMEM mit Phenolrotzusatz + 10 % FCS + 1 % P/S
Normalmedium (1321N1, stabil transfiziert)	DMEM mit Phenolrotzusatz + 10 % FCS + 1 % P/S + 250µg/ml Hygromycin-B
Normalmedium (U87-MG)	DMEM mit Phenolrotzusatz + 10 % FCS + 1 % P/S
Normalmedium (U87-MG, stabil transfiziert)	DMEM mit Phenolrotzusatz + 10 % FCS + 1 % P/S + 100µg/ml Hygromycin-B
Assay-Medium (MTT)	DMEM ohne Phenolrotzusatz
Assay-Medium (Luciferase, stabile Zellen)	DMEM mit Phenolrotzusatz
Assay-Medium (transiente Transfektion)	DMEM ohne Phenolrotzusatz

5.13 Stämme von *E.coli*

Für die Expression von Plasmiden wurden die *Escherichia coli*-Stämme DH5α und JM109 verwendet.

	Genotyp
DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1983, Sambrook & Russel, 2001)
JM109 (NEB#E4107S)	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , λ^- , Δ (<i>lac-proAB</i>) [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ <i>M25</i>] (Yanisch-Perron, 1985) (bezogen von New England Biolabs, Frankfurt)

5.14 Zelllinien

Humane Astrozytomzelllinie 1321N1

Die Zellen der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1 wurden dankend von Prof. Dr. Gustav Jirikowski (Institut für Anatomie II, Universität Jena) erhalten. Für Experimente wurden lediglich Zellen der Passagenzahlen 3-15 nach der Inkulturnahme verwendet, um Einflüsse

auf die Ergebnisse aufgrund alterungsbedingter Veränderungen der Zelleigenschaften ausschließen zu können.

Humane Glioblastomzelllinie U87-MG

Zellen der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG, die ursprünglich von der American Type Culture Collection (ATCC, Mannassas, VA, USA) erhalten worden waren, wurden mit Passagezahl 146 von Prof. Dr. Armin Buschauer (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie II, Universität Regensburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Experimente wurden lediglich Zellen der Passagezahlen 149-160 verwendet.

5.15 Drogenmaterial

***Tabernaemontana pandacqui* LAM. (Nummer 2576-10)**

Die getrockneten Blätter von *T. pandacqui* wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jörg Heilmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt. Das Pflanzenmaterial wurde 2006 in Vanuatu gesammelt und sowohl vor Ort im National Herbarium in Port Vila (Vanuatu) als auch in den Royal Botanic Gardens (Kew, London, Großbritannien) auf Identität geprüft (Bradacs, 2008a).

Drogen aus der Traditionellen Chinesischen Medizin

Tabelle 2:

Untersuchte kommerziell erworbenen TCM-Drogen

Droge	Chargenbezeichnung	Lieferant
Arisaematis rhizoma	030601H116	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach
Coptidis rhizoma	040801H053	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach
Curcumae longae tuber	040801H056	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach
Cynomorii herba	040801H349	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach
Drynariae rhizoma	15569	Kräuter Schulte, Gernsbach
Gardeniae fructus	051101H061	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach
Gleditsiae fructus	15570	Kräuter Schulte, Gernsbach
Polygonati rhizoma	050501H152	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach
Sappan lignum	21965	Kräuter Schulte, Gernsbach
Scutellariae radix	070201H089	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach
Sophorae (flavescentis) radix	050801H092	Herbasin Hilsdorf GmbH, Rednitzhembach

5.16 Getestete Substanzen und Extrakte

Die im Folgenden aufgelisteten Substanzen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jochen Lehmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Verfügung gestellt. Huperzin wurde dankend von Prof. Dr. Jörg Heilmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg) erhalten. Die Strukturformeln der Substanzen sind im Anhang (Abbildung A1, A2 und A3) dargestellt.

Tabelle 3:
Untersuchte Reinsubstanzen

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration Stammlösung [mM]	Getestete Konzentration [µM]
ANTHCL	DMSO	10, 100	10, 100
Atorvastatin	DMSO	10, 100	10, 100
Dibutyl- γ -cAMP	Medium, serumfrei	100	500, 1000
E 5	DMSO	10, 100	10, 100
E 8	DMSO	10, 100	10, 100
E 11	DMSO	10, 100	10, 100
FL 15	DMSO	10, 100	10, 100
FL 16	DMSO	10, 100	10, 100
FL 38	DMSO	10, 100	10, 100
FL 44	DMSO	10, 100	10, 100
FL 56	DMSO	10, 100	10, 100
Flurbiprofen	DMSO	10, 100	10, 100
Galantamin	DMSO	10, 100	10, 100
Huperzin A	DMSO	10, 100	10, 100
INTOME	DMSO	10, 100	10, 100
LEKL 1	DMSO	10, 100	10, 50, 100
LEKL 4	DMSO	10, 100	10, 50, 100
LEKL 8	DMSO	10, 100	10, 100
LEKL 12	DMSO	10, 100	10, 100
LEKL 20	DMSO	10, 100	10, 100
LEKL 24	DMSO	10, 100	10, 100
LEKL 27	DMSO	10, 100	10, 100
LEKL 28	DMSO	10, 100	10, 50, 100
LEYS 513	DMSO	10, 100	10, 100
LEYS 514	DMSO	10	10
LEYS 517	DMSO	10	10, 5
LEYS 530	DMSO	10, 100	10, 100
LEYS 534	DMSO	10, 100	10, 100
LEVH	DMSO	10, 100	10, 100
Lovastatin	DMSO	10, 100	10, 100
PARCL	DMSO	10, 100	10, 100
PARFLU	DMSO	10, 100	10, 100
PMA	DMSO	0,5	0,5
Pravastatin	DMSO	10, 100	1, 10, 100
Rivastigmin	DMSO	10, 100	10, 100
Simvastatin	DMSO	10, 100	1, 10, 100
Tacrin	DMSO	10, 100	10, 100
TCC	DMSO	10, 100	10, 100
THBC	DMSO	10, 100	10, 100
Y 3	DMSO	10, 100	10, 100
Y 20	DMSO	10, 100	10, 100

Die im Folgenden aufgelisteten TCM-Extrakte wurden selbst hergestellt. Die restlichen Extrakte wurden von Prof. Dr. Jörg Heilmann, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg, erhalten. Auch hier wurde das Pflanzenmaterial 2006 in Vanuatu gesammelt und sowohl vor Ort im National Herbarium in Port Vila, (Vanuatu) als auch in den Royal Botanic Gardens (Kew, London, Großbritannien) auf Identität geprüft. Die interne Nr. der Extrakte der Vanuatu-Wildsammlung entspricht ihrer Voucher No. (Bradacs, 2008a).

Die getesteten Extrakte wurden in DMSO zu 50 mg/ml aufgenommen. Lediglich die TCM-Extrakte (Auszugsmittel Wasser) wurden zu 5 mg/ml in Wasser gelöst.

Tabelle 4:
Untersuchte Pflanzenextrakte

Interne Nr.	Pflanze	Verwendetes Pflanzenteil	Auszugsmittel
TCM 1	<i>Arisaema erubescens</i> (Wall.) Schott, Araceae	Wurzelstock	Wasser, Methanol
TCM 2	<i>Curcuma wenyujin</i> Y.H. Chen et C. Ling., Zingiberaceae	Wurzelknolle	Wasser, Methanol
TCM 3	<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Sm., Polypodiaceae	Wurzelstock	Wasser, Methanol
TCM 4	<i>Gleditsia sinensis</i> LAM., Fabaceae	Frucht	Wasser, Methanol
TCM 5	<i>Caesalpinia sappan</i> L., Caesalpinaceae	Rinde	Wasser, Methanol
TCM 6	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red., Liliaceae	Wurzelstock	Wasser, Methanol
TCM 7	<i>Cynomorium songaricum</i> Rupr., Cynomoriaceae	Kraut	Wasser, Methanol
TCM 8	<i>Coptis chinensis</i> Franch, Ranunculaceae	Wurzelstock	Wasser, Methanol
TCM 9	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi, Lamiaceae	Wurzel	Wasser, Methanol
TCM 10	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis, Rubiaceae	Frucht	Wasser, Methanol
TCM 11	<i>Sophora flavescens</i> Ait., Fabaceae	Wurzel	Wasser, Methanol
0186-12	<i>Dracontomelon vitiense</i> ENGL., Anacardiaceae	Innere Rinde	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
0276-1	<i>Euodia latifolia</i> DC., Rutaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
0476-1.2	<i>Aidia racemosa</i> (CAV.) D.D. TIRVENG., Rubiaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
0476-1.5	<i>Allophylus timoriensis</i> DC. BL., Sapindaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
0476-1.6	<i>Dysoxylum arborescens</i> (BL.) MIQ., Meliaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
0476-2.1	<i>Gyrocarpus americanus</i> JACQ., Hernandiaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
1686-1.2	<i>Bidens pilosa</i> L., Asteraceae	gesamte Pflanze	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
1686-1.13	<i>Grewia inmac</i> GUILL., Sparrmanniaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol

Tabelle 4: Fortsetzung
Untersuchte Pflanzenextrakte

Interne Nr.	Pflanze	Verwendetes Pflanzenteil	Auszugsmittel
1786-6C	<i>Baccaurea stylaris</i> MUELL. ARG., Phyllanthaceae	Innere Rinde	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
1786-6F	<i>Baccaurea stylaris</i> MUELL. ARG., Phyllanthaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2176-1	<i>Intsia bijuga</i> (COLEBR.) O. KTZE., Leguminosae-Caesalpinioideae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2176-7L1	<i>Macaranga tanarius</i> (L.) MUELL. ARG., Euphorbiaceae	Innere Rinde Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2176-7L2C	<i>Macaranga dioica</i> MUELL. ARG., Euphorbiaceae	Innere Rinde	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2176-7L2F	<i>Macaranga dioica</i> MUELL. ARG., Euphorbiaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2176-10	<i>Macropiper latifolium</i> (L.F.), Piperaceae	Stamm	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2576-4	<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) SM., Zingiberaceae	Rhizom	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2576-10	<i>Tabernaemontana pandacqui</i> LAM. II, Apocynaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2766-1.1	<i>Acalypha grandis</i> BENTH., Euphorbiaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2766-1.9	<i>Pipturus argenteus</i> WEDD., Urticaceae	Innere Rinde	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
2966-2	<i>Tabernaemontana pandacqui</i> LAM. I, Apocynaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol
3066-2	<i>Syzygium malaccense</i> (L.) MERR. & L.M. PERRY, Myrtaceae	Blätter	Dichlormethan, Ethylacetat, Methanol

6 Zellkultur

6.1 Humane Astrozytomzelllinie 1321N1

Die Aufbewahrung der in Einfriermedium suspendierten Zellen erfolgte in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Zur Inkulturnahme wurde eine Zellkonserve im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend sofort in einem PP-Röhrchen mit 7 ml Normalmedium (1321N1) versetzt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei $600 \times g$ für 5 min. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Normalmedium (1321N1) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit

15 ml Normalmedium (1321N1) in einer 75cm²-Flasche im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Bis zur Ausbildung der Konfluenz wurden die Zellen regelmäßig auf ihr Aussehen untersucht. Gegebenenfalls wurde das Medium gewechselt, wenn ein Umschlagen des pH-Wertes durch das im Medium enthaltene Phenolrot angezeigt wurde.

Zur Subkultivierung („Splitten“) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Durch leichtes Klopfen und Schwenken der Kulturflasche wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst. Die Zugabe von 5 ml Medium inaktivierte die Trypsinwirkung. Mit Hilfe einer Pipette wurde die Zellsuspension in ein PP-Röhrchen überführt und anschließend bei 600 × g für 5 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in Normalmedium (1321N1) resuspendiert und entweder zur routinemäßigen Subkultivierung im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in neue Kulturflaschen ausgesät oder für Zellassays verwendet. Eine Subkultivierung der Zellen erfolgte zwei- bis dreimal wöchentlich.

Bei niedrigen Passagenzahlen wurden Zellen zum Zwecke der Tiefkühlagerung erneut zentrifugiert, die Zellen in Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

6.2 Stabil transfizierte 1321N1-Zellen

Die routinemäßige Kultivierung der stabil transfizierten 1321N1-Zellen erfolgte analog zu den 1321N1-Zellen. Hier wurde jedoch dem Normalmedium (1321N1) das Antibiotikum Hygromycin-B in einer Konzentration von 250 µg/ml zugesetzt. Durch diesen Selektionsdruck wurde die Vermehrung von Zellen verhindert, die das Reporterplasmid nicht stabil ins Genom integriert hatten, da sich auf diesem Plasmid, welches für *Luciferase* codiert, auch ein Resistenzgen für Hygromycin-B befindet. Somit haben stabil transfizierte Zellen einen Selektionsvorteil, da durch das Plasmid eine Resistenz gegenüber Hygromycin-B vermittelt wird, während untransfizierte Zellen durch das Antibiotikum abgetötet werden.

6.3 Humane Glioblastomzelllinie U87-MG

Auch hier erfolgte die routinemäßige Kultivierung analog zu den 1321N1-Zellen. Unterschiedlich war lediglich die Menge von verwendetem Trypsin/EDTA zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche (2 ml anstatt 1 ml) und die Frequenz der Subkultivierung sowie das Verhältnis der Aussaat der Zellen (ein- bis zweimal wöchentlich 1:5 bis 1:10).

6.4 Stabil transfizierte U87-MG-Zellen

Stabil transfizierte U87-MG Zellen wurden analog zu den untransfizierten Zellen kultiviert. Die Selektion auf Zellen, die den *Luciferase*-Reporter-Vektor stabil ins Genom aufgenommen hatten, erfolgte mit 100 µg/ml Hygromycin-B.

7 Genetische Polymorphismen im *APOE*-Gen der Astrozytomzelllinie 1321N1

7.1 Kodierende Region des *APOE*-Gens

Zur Charakterisierung der 1321N1-Zellen hinsichtlich der *APOE*-Allele wurde die kodierende Region des *APOE*-Gens genauer untersucht. Wie in Kapitel 2.2 erläutert, kommen in der Natur die Allele *APOE*ε2, *APOE*ε3 und *APOE*ε4 vor. Die Genotypisierung dieser Region erfolgte nach zwei Varianten. Zum einen wurde an genomischer DNA eine PCR durchgeführt, die ein Produkt ergab, welches den Genabschnitt einschloss, der für die Punktmutationen kodierte. Durch anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes konnte eine Genotypisierung erfolgen. Zum anderen wurden die Allele durch Klonierung dieses PCR-Produktes in den Vektor pGEM[®]-T (Promega) und anschließende Transformation in *E.coli* aufgetrennt und mittels *Real-Time*-PCR bestimmt.

7.1.1 Sequenzierung eines PCR-Produkts

Die PCR zur Amplifizierung des gewünschten Genabschnitts wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Programmschritt	Zyklen	Nr.	Temp. [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	1	1	95	300
Amplifizierung	30	1	95	30
		2	62,5	30
		3	72	60
Elongation	1	1	72	300

Es wurden die Primer Genotyp.ApoE.for und Genotyp.ApoE.rev verwendet. Das zu erwartende PCR-Produkt hatte eine Länge von 468 bp und umschließt die beiden Allelbestimmenden Punktmutationen an den Positionen 3937 und 4075 (Kurtz *et al.* 2004).

Der PCR-Reaktionsansatz (50 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

0,25	µl	GoTaq [®] Polymerase
10	µl	5× Reaktionspuffer
2	µl	genomische DNA (1321N1, entsprechend 5 µg)
0,5	µl	Primer Genotyp.ApoE.for
0,5	µl	Primer Genotyp.ApoE.rev
0,5	µl	dNTPs 25 mM
36,25	µl	H ₂ O

Die genomische DNA wurde nach der Methode „Präparation von genomischer DNA“ (Kapitel 9.1.4) aus Zellen der Zellkultur gewonnen. Eine Aufreinigung des PCR-Produktes fand über Agarose-Gel-Elektrophorese und anschließender Elution der entsprechenden Bande mit dem *Qiaquick[®] Gel Extraction Kit* (Qiagen) statt. Eine Sequenzierung wurde durch Eurofins MWG Operon (Martinsried) unter der Verwendung des Primers Genotyp.ApoE.for durchgeführt.

7.1.2 Real-Time-PCR

Das erhaltene Produkt der in Kapitel 7.1.1 beschriebenen PCR wurde nach Angaben des Herstellers in den Vektor pGEM[®]-T (Promega) ligiert und nach einer Ethanolfällung mittels Elektroporation in den *E.coli*-Stamm DH5α eingebracht. Nach Wachstum der Kultur auf einer mit Ampicillin versetzten LB-Agarplatte wurden 20 Klone selektiert, in Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert und dann daraus Plasmid-DNA präpariert (siehe Kapitel 8.1). Zur Qualitätskontrolle wurde das Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen *Nco* I und *Sal* I verdaut, welche das *insert* (PCR-Produkt) aus dem Vektor schneiden. Die zu

erwartenden Fragmentgrößen betrugen 488 bp (*insert*) und 3 kb (Vektor). Vier DNAs mit richtigem Bandenmuster wurden mittels *Real-Time-PCR* untersucht.

Die Primer zur Detektion der Punktmutationen wurden von Kurtz *et al.* (2004) übernommen. Sie sind so gewählt, dass jeweils das 3'-Ende des *Forward*-Primers bzw. des *Reverse*-Primers auf der Punktmutation enden. Folgende Primerkombinationen wurden verwendet:

APOEε2: ApoE3-rt-5-1 und ApoE2-rt-3-1 (Detektion Position 3937 T und 4075 T)

APOEε3: ApoE3-rt-5-1 und ApoE4-rt-3-1 (Detektion Position 3937 T und 4075 C)

APOEε4: ApoE4-rt-5-1 und ApoE4-rt-3-1 (Detektion Position 3937 C und 4075 C)

APOEεx: ApoE4-rt-5-1 und ApoE2-rt-3-1 (Detektion Position 3937 C und 4075 T)

Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pOTB7ApoE3 eingesetzt, welches für *APOEε3* kodiert. Das Primerpaar für *APOEεx* diente zusammen mit diesem Plasmid als Negativkontrolle, da die Kombination der Basen 3937 C und 4075 T (*APOEεx*) beim Menschen natürlicherweise nicht vorkommt. Alle Plasmide wurden in der Konzentration von 0,0018 µg/µl eingesetzt und jeweils unter Verwendung jedes Primerpaars amplifiziert. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

8,625	µl	H ₂ O
12,5	µl	PCR-Reaktionsmix (2× Brilliant [®] SYBR [®] Green QPCR Master Mix)
1,25	µl	Primer <i>forward</i> (1:10 verdünnt)
1,25	µl	Primer <i>reverse</i> (1:10 verdünnt)
1,0	µl	DNA (entsprechend 0,0018 µg/µl Plasmid)
0,375	µl	ROX (verdünnt entsprechend den Angaben des Herstellers)

Die *Real-Time-PCR* wurde unter folgenden Bedingungen in Anlehnung an Kurtz *et al.* (2004) durchgeführt:

Programmschritt	Zyklen	Nr.	Temp. [°C]	Zeit [s]	Fluoreszenz-detektion
Denaturierung	1	1	95	600	
Amplifizierung	40	1	95	30	***
		2	60	60	
		3	72	30	
Elongation	1	1	72	600	
Schmelzkurve	1	1	95	60	***
		2	55	30	
		3	95	30	

Im Anschluss daran wurde die Plasmid-DNA zweier mittels *Real-Time-PCR* bestimmten Klone zur Kontrolle zu Eurofins MWG Operon (Martinsried) zur Sequenzierung eingeschickt.

7.2 Polymorphismen in der *APOE*-Promotorregion: Sequenzierung eines PCR-Produkts

Um die in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Punktmutationen der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors bestimmen zu können, wurde zuerst eine PCR an genomischer DNA durchgeführt. Die DNA wurde nach der Methode „Präparation von genomischer DNA“ (Kapitel 9.1.4) aus Zellen der 1321N1-Zellkultur gewonnen. Die PCR wurde analog zu der in Kapitel 7.1.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur des PCR-Programms betrug 65 °C. Die Elongationszeit des Schrittes „Amplifizierung“ wurde auf 180 s und die Elongation auf 600 s verändert, um hier die Bildung eines PCR-Produktes der Länge 1426 bp zu ermöglichen. Zur Amplifizierung der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors (-1011 bis +400) wurden die Primer betagal.for und betagal.rev verwendet. Das PCR-Produkt wurde nach Agarose-Gel-Elektrophorese mittels *Qiaquick*[®] *Gel Extraction Kit* (Qiagen) aufgereinigt und von Eurofins MWG Operon (Martinsried) sequenziert. Um die Sequenz des vollständigen Fragmentes zu erhalten, wurden beide Primer zur Sequenzierung verwendet.

8 Charakterisierung der *APOE*-Promotorregion: Molekularbiologische Methoden zur Klonierung der Plasmide

8.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die gentechnischen Standardmethoden wurden nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt. Diese umfassen Plasmidpräparationen, PCR, Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen, Ligation, Ethanol-fällung, Transformation von Bakterien-Stämmen (*E.coli*) und Agarose-Gel-Elektrophorese.

8.2 Doppelstrangmutagenesen

Die Durchführung der Doppelstrangmutagenesen orientierte sich am Handbuch des *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Version 2004).

Mit Hilfe einer Doppelstrangmutagenese ist es möglich, gezielt Punktmutationen in Plasmide einzuführen. Dazu werden zwei komplementäre Primer gewählt, die in ihrer Sequenz die gewünschte Mutation enthalten, in allen anderen Basen jedoch mit der Sequenz des ursprünglichen Plasmids übereinstimmen. Wird nun das Plasmid mittels PCR unter Verwendung der entsprechenden Primer vervielfältigt, erfolgt bei jedem neu amplifizierten Plasmid die Einführung der gewünschten Mutation. Doppelstrangmutagenesen wurden an folgenden Plasmiden durchgeführt:

pGL4.14-25037	Einführung der Punktmutation -491 T zu A
	Einführung der Punktmutation -219 G zu T
pGL4.14-25038	Einführung der Punktmutation -219 G zu T

Um die Punktmutation -491 T zu A zu erzeugen, wurde die Primerkombination ApoEMut_T-491A.for und ApoEMut_T-491A.rev verwendet, für die Punktmutation -219 G zu T die Kombination aus ApoEMut_G-219T.for und ApoEMut_G-219T.rev.

Im ersten Schritt fand die Einführung der Punktmutation in das Plasmid statt. Für diese Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

1	μl	<i>Pfu</i> -Polymerase
5	μl	10× Reaktionspuffer
0,75	μl	Plasmid (entsprechend 100 ng)
2	μl	Mutationsprimer <i>forward</i> (1:10)
2	μl	Mutationsprimer <i>reverse</i> (1:10)
3	μl	dNTPs 2 mM
36,25	μl	H ₂ O

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Programmschritt	Zyklen	Nr.	Temp. [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	1	1	95	30
Amplifizierung	12	1	95	30
		2	55	60
		3	72	720

Im Anschluss daran wurde der PCR-Ansatz für 1 h bei 37 °C im Wasserbad mit dem Restriktionsenzym *Dpn* I (Zielsequenz 5'-Gm⁶ATC-3') verdaut. Dieses Enzym baut selektiv methylierte und hemimethylierte DNA ab. Dieser Schritt diente zur Selektion auf das neu gebildete mutierte Plasmid. Es wird lediglich das ursprüngliche Plasmid gespalten, da dieses im Gegensatz zum neu gebildeten Plasmid aus Stämmen von *E.coli* isoliert wurde und somit dam-Methylierung aufweist.

Nach einer Ethanol-fällung des gewonnenen Plasmids wurde dieses in 10 µl H₂O aufgenommen und mittels Elektroporation in *E.coli* eingebracht. Klone wurden nach einer DNA-Präparation auf Aufnahme des Plasmids untersucht. Hierzu fand ein Verdau der DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind* III (Zielsequenz A'AGCTT) statt. Dieses schneidet den Vektor an zwei Stellen und führt so zur Entstehung von Fragmenten der Größe 1,4 kb und 6 kb. Klone, die das spezifische Bandenmuster zeigten, wurden weiter zum PCR-Screening auf erfolgreiche Punktmutation eingesetzt. Zur Detektion der Punktmutation -219 T wurde die Primerkombination ApoE-219Tscreen2.for und betagal.rev (Produktgröße 650 bp) verwendet. Für -491 A wurden die Primer betagal.for und ApoE-491Ascreen.rev (Produktgröße 554 bp) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente jeweils das nicht-mutierte Ursprungsplasmid. Die PCR wurde mit folgendem PCR-Ansatz und -Programm durchgeführt:

PCR-Ansatz:

0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase	Programmschritt	Zyklen	Nr.	Temp. [°C]	Zeit [s]
5 µl	10× Reaktionspuffer	Denaturierung	1	1	95	120
1 µl	Plasmid (entsprechend 40 ng)	Amplifizierung	25	1	95	30
3 µl	Primer <i>forward</i> (1:10)			2	60	30
3 µl	Primer <i>reverse</i> (1:10)			3	72	120
4 µl	dNTPs 2 mM	Elongation	1		72	600
33,5 µl	H ₂ O					

Die DNA-Sequenz der positiven Klone wurde durch Eurofins MWG Operon (Martinsried) bestimmt.

9 Reporter-gen-Assay zur Identifizierung *APOE*-modulierender Verbindungen

9.1 Molekularbiologische Methoden in humanen Zellen

9.1.1 Transfektion

Die Transfektion von humanen Zellen wurde mit Hilfe des Reagenzienkits *DreamFectTM* der Firma OZ Biosciences durchgeführt. Dieses ist ein Lipofektionsreagenz basierend auf der Tee-Technologie (*triggered endosomal escape*). Hier werden Eigenschaften von kationischen Lipiden (Lipoplexe) und Polymeren (Polyplexe) kombiniert, welche zu den meist genutzten nicht-viralen Transfektionsreagenzien gehören. *DreamFectTM* gehört zur Gruppe der Lipopolyamine und hat sowohl einen lipophilen Anteil als auch einen geladenen Polyamin-Anteil. Durch elektrostatische Interaktionen zwischen den Nukleinsäuren und *DreamFectTM* entstehen positiv geladene Komplexe. Diese lagern sich an der Zelloberfläche an und werden durch Endozytose aufgenommen. Auf diese Weise gelangen große Mengen DNA in die Zelle. Sie können mit dieser Methode sowohl transient in die Zelle eingebracht als auch stabil in das Genom integriert werden (*DreamFectTM Instruction Manual*, Version 2.1).

Die Transfektionsbedingungen wurden der Anweisung des Herstellers entnommen. Für 2 µg DNA wurden 8 µl *DreamFectTM* verwendet. Die Bildung des Transfektionskomplexes fand in serumfreiem Zellkulturmedium statt.

Transfektion zur Generierung stabiler Zelllinien

Hierfür wurden 1×10^5 Zellen in ein *well* einer 6*well*-Mikrotiterplatte mit 2 ml Normalmedium eingesät. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml serumfreies Medium ersetzt. Laut Herstellerangaben wurden sowohl 2 µg der entsprechenden DNA als auch 8 µl *DreamfectTM* zu 100 µl mit serumfreiem Medium ergänzt und anschließend zur Formung des Transfektionskomplexes vereinigt. Da die Bildung des Komplexes nach Angaben des Herstellers 15 min dauert, wurde nach dieser Wartezeit der Transfektionskomplex zu den Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde das serumfreie Medium abgesaugt und durch 2 ml Normalmedium ersetzt. Nach 48 h wurde zur Selektion transfizierter Zellen Hygromycin-B zugegeben.

Transiente Transfektion zur Reporter-gen-Analyse

Zur transienten Transfektion humaner Zellen wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in ein *well* einer 6*well*-Mikrotiterplatte mit 2 ml Normalmedium eingesät. Die Durchführung der Transfektion fand

analog der zur Generierung stabiler Zelllinien statt. Nach der Inkubationszeit von 4 h wurden die Zellen für den modifizierten Reportergen-Assay verwendet.

9.1.2 Selektion mit Hygromycin-B

Um eine Selektion mit dem Antibiotikum Hygromycin-B auf transfizierte Zellen durchführen zu können, musste zuerst für die zu selektionierende Zelllinie die effektive Konzentration experimentell bestimmt werden. Das ist die Konzentration, bei der untransfizierte Zellen, die das Resistenzgen nicht über das Plasmid erhalten haben, absterben. Getestet wurden hierfür Konzentrationen zwischen 50 µg/ml und 1000 µg/ml. Dafür wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Normalmedium pro *well* einer 6*well*-Mikrotiterplatte ausgesät, und am darauf folgenden Tag das Antibiotikum in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Jeweils ein *well* pro Platte wurde zu Kontrollzwecken nicht mit Hygromycin-B behandelt. Die Zellen wurden von nun an täglich auf ihr Aussehen untersucht. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt und erneut das Antibiotikum in entsprechender Konzentration zugesetzt. Es wurde zur Selektion die Konzentration ausgewählt, bei welcher nach sieben Tagen die Mehrheit aller Zellen abgestorben war.

9.1.3 Isolierung von Klonen

Die Klone wurden nach Selektion durch Hygromycin-B aus einer 6*well*-Mikrotiterplatte isoliert. Hierzu wurde die Platte unter einem Mikroskop betrachtet und die Klone mit einem Stift markiert. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen an der Laminarbox die Klone einzeln durch Absaugen mit einer 100 µl-Pipette in eine 24*well*-Mikrotiterplatte überführt. Das vollständige Absaugen der Klone wurde durch eine erneute Betrachtung unter dem Mikroskop überprüft.

9.1.4 Präparation von genomischer DNA

Eine Isolierung von genomischer DNA fand sowohl aus Vollblut als auch aus Zellen der regulären Zellkultur statt.

Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut

Hierfür wurde die Arbeitsanleitung von Bornemann-Kolatzki (2004) in modifizierter Form verwendet. Um die Zellen zum Platzen zu bringen, wurden 3 ml Vollblut mit 7 ml vollentsalztem Wasser versetzt, 2 – 3 min gemischt und anschließend bei $3300 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Pellet mit den Zellkernen wurde in 2 ml Nonidet (0,1 %) resuspendiert. Die Suspension wurde bei $16000 \times g$ für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Proteinase-K-Puffer resuspendiert und anschließend mit 70 μ l SDS (10 %) und 50 μ l Proteinase K versetzt. Der Ansatz wurde für mindestens 2 h im Wasserbad bei 56 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden 350 μ l 6 M NaCl zugegeben und für 2 min kräftig bis zur Schaumbildung geschüttelt. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei $3300 \times g$ wurde der Überstand zum Fällern der DNA in 5 ml 100 %igen Ethanol gegeben. Die gefällte DNA wurde mit einer Impföse aus der Lösung entfernt. Wurde die DNA in einer adäquaten Menge $1 \times$ TE-Puffer gelöst, fand eine Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C statt. In Wasser (reinst) gelöste DNA wurde hingegen bei -20 °C tiefgekühlt gelagert.

Isolierung von genomischer DNA aus humanen Zellen

Die Zellen der humanen Zellkultur wurden nach dem Ablösen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche für 5 min bei $600 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde direkt in 2 ml Nonidet (0,1 %) resuspendiert. Auf ein Platzen der Zellen in vollentsalztem Wasser wurde hier verzichtet. Die restlichen Arbeitsschritte entsprachen der Isolierung aus Vollblut.

Des Weiteren wurde zur Isolierung von genomischer DNA aus humanen Zellen das *DNeasy[®] Tissue Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

9.1.5 Isolierung von Total-RNA

Nach Stimulation der Zellen in einer 6well-Mikrotiterplatte wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und Flüssigkeitsreste mehrfach abgesaugt. Die Isolierung der Total-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy[®] Mini Kit* gemäß den Angaben des beigelegten Handbuchs (*RNeasy[®] Mini Handbook, Version April 2006, Protocol Animal Cells*). Dem

Puffer RLT wurde β -Mercaptoethanol in entsprechender Menge zugesetzt. Auch der *On-Column*-DNase-Verdau wurden gemäß dem *RNeasy*[®]-Handbuch durchgeführt. Im letzten Schritt wurden die Total-RNAs mit 50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Eine Überprüfung der Qualität und Quantität der Total-RNAs fand mittels photometrischer Messung mit dem BioPhotometer statt. Die RNA-Lösungen wurden bei -80 °C gelagert.

9.2 Luciferase-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten Zellen

Die Verwendung von *Luciferase* als Reportergen ist eine beliebte Methode für Genexpressionsanalysen einzelner Gene, da direkt nach der Translation ein funktionsfähiges Enzym entsteht, dass in einem schnellen, einfachen und zuverlässigem Assay quantifiziert werden kann (De Wet *et al.*, 1987). Zur Suche nach *APOE*-mRNA-modulierenden Substanzen und Extrakten wurde die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors in das promotorlose Plasmid pGL4.14 eingebracht (siehe Kapitel 14). Dieses enthält sowohl das *luc2*-Gen welches für das Enzym Luciferase des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*, Firefly) kodiert, als auch eine Domäne, die eine Hygromycin-Resistenz in transfizierten Zellen vermittelt. Dies ermöglicht neben der Durchführung transienter Messungen auch die Generierung von stabilen Zelllinien durch Selektion mit diesem Antibiotikum. Prinzipiell bestehen also zwei Möglichkeiten, den Reportergen-Assay durchzuführen. Zum einen kann man eine stabile Zelllinie generieren, welche das Vektorkonstrukt aus Promotor und *Luciferase* ins Genom integriert hat und zum anderen besteht die Möglichkeit einer transienten Transfektion. Hierbei wird das Vektorkonstrukt in die Zelle eingebracht, ohne im Anschluss daran mittels eines Antibiotikums auf Zellen zu selektionieren, welche das Plasmid aufgenommen haben (vgl. Kapitel 11). Die Vorteile dieser Methode liegen in der schnellen Durchführbarkeit der Messung, wohin gegen eine stabile Zelllinie erst über einen längeren Zeitraum selektioniert werden muss. Messungen mit einer stabilen Zelllinie sind jedoch weitaus praktikabler durchzuführen, da keine weiteren Transfektionen mehr nötig sind.

Um eine stabile Zelllinie für die Durchführung eines Luciferase-Reportergen-Assays zu erhalten, wurden sowohl 1321N1-Zellen als auch U87-MG-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Plasmid (pGL4.14-25027, -25037, -25038, -25039 und -25040, Kapitel 5.8.2) wie in Kapitel 9.1.1 beschrieben transfiziert, einzelne Klone isoliert (siehe Kapitel 9.1.3), und anschließend auf Luciferase-Aktivität getestet.

9.2.1 Testprinzip

Da die Bildung der Luciferase an eine Aktivierung bzw. Hemmung des *APOE*-Promotors gekoppelt ist, ist es über Enzymmessung möglich, den Einfluss von Substanzen oder Extrakten auf die Aktivität des klonierten Promotorfragments zu untersuchen. Das Enzym Luciferase katalysiert die Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin (Abbildung 12) im Beisein von Mg^{2+} , ATP und Sauerstoff. Dies geht mit der Emission biolumineszenten Lichtes einher.

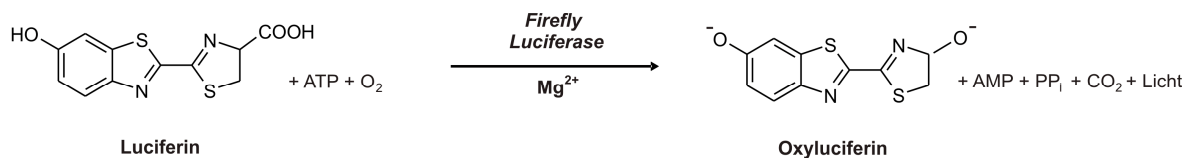


Abbildung 12:
Biolumineszenz-Reaktion, katalysiert durch *Firefly*-Luciferase (modifiziert nach Qiagen, 2006b).

Das emittierte Licht kann mittels eines Luminometers quantifiziert werden, wobei die Enzym-Menge mit der relativen Lichtausbeute (*relative light units*, RLU) korreliert und letztere somit als Maß für den Einfluss von Testsubstanzen auf den *APOE*-Promotor im Sinne einer Induktion oder Repression der Expression des Reportergens gesehen werden kann. Als Wert wird dies in der Berechnung der *fold changes* deutlich gemacht. Diese setzen die Luciferase-Aktivität, ausgedrückt in RLU, von Kontroll- und Stimulationsexperiment ins Verhältnis und quantifizieren somit die Regulation des Reportergens über eine Beeinflussung des *APOE*-Promotors.

9.2.2 Durchführung

Der Assay wurde sowohl mit stabil transfizierten 1321N1- als auch mit U87-MG-Zellen durchgeführt. Aus der bei der Subkultivierung der entsprechenden Zellen (siehe Kapitel 6) erhaltenen Zellsuspension wurden 50 μl im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Nach entsprechender Verdünnung mit Normalmedium (U87-MG, 1321N1) wurden mit einer Mehrkanalpipette 1×10^5 Zellen pro *well* einer 96*well*-Mikrotiterplatte ausgesät (entsprechend 180 μl Zellsuspension pro *well*). Hierbei wurden die *wells* der äußeren Reihe lediglich mit 200 μl PBS befüllt und nicht für den Assay verwendet, da Zellen am Rand von Mikrotiterplatten ein abweichendes Wachstumsverhalten im Vergleich zu Zellen in den weiter

innen liegenden *wells* zeigen können (Rasmussen und Nielsen, 2002). Nach der Aussaat wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Herstellung der Arbeitslösungen erfolgte durch Verdünnen der Stammlösungen der Testsubstanzen im Verhältnis 1:100 (Extrakte, Substanzen) bzw. 1:10 (Dibutryl-cAMP, wässrige TCM-Extrakte). Es wurden 20 µl der jeweiligen Arbeitslösung in die entsprechenden *wells* pipettiert. Als Kontrolle diente DMSO (Endkonzentration 0,1 %). Da Dibutryl-cAMP bzw. die wässrigen TCM-Extrakte jedoch nicht in DMSO gelöst waren, wurden dieser Arbeitslösung noch DMSO (Endkonzentration 0,1 %) zugesetzt. Pro Substanz wurden jeweils sechs *wells* nach folgendem Schema pipettiert:

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	PBS
PBS	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	PBS
PBS	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	PBS
PBS	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	PBS
PBS	DMSO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

}

Luci-ferase

}

MTT

Abbildung 13:

Plattenbelegung einer 96well-Mikrotiterplatte des Luciferase-Reportergen-Assays (stabil transfizierte Zellen).

Eine Inkubation mit Substanz- bzw. Extraktlösungen erfolgte für 24 h. Im Anschluss wurde in drei *wells* jeweils die Luciferase-Aktivität bestimmt, die drei anderen *wells* dienten zur Bestimmung der Lebendzellzahl (MTT-Assay, siehe Kapitel 9.2.3). Die Aktivität der Luciferase wurde mit dem *Bright-GloTM Luciferase Assay System* im MTP-Reader FLUOStar Galaxy gemessen. Dazu wurde vor Verwendung des Kits mit der Mehrkanalpipette der Überstand abgesaugt und 50 µl Assay-Medium (Luciferase, stabile Zellen, DMEM mit Phenolrotzusatz) auf die Zellen pipettiert. Die Vermessung der durch das Reagenz lysierten Zellen fand in einer LUMITRAC[®] 200 96well-MTP statt. Zur *Blank*-Bereinigung der Messwerte (Nullwert) wurden drei Parallelen mit reinem Medium und dem Reagenz des *Bright-GloTM Luciferase Assay System* durchgeführt. Von den Ergebnissen (Angabe in RLU) wurde der Mittelwert errechnet und von den Messwerten der Proben subtrahiert. Zur Auswertung erfolgte die Berechnung der *fold changes* nach folgender Gleichung:

$$\text{fold change} = \frac{(RLU_{\text{Test}} / A_{\text{Test}})}{(RLU_{\text{DMSO}} / A_{\text{DMSO}})}$$

RLU = relative Lichtausbeute (*relative light units*)

A = Absorption (MTT-Assay)

Es wurden je drei unabhängige Messungen in einem Triplet durchgeföhrt ($n = 3$). Beim Screening wurden alle Extrakte/Substanzen mit einem *fold change* kleiner 0,6 oder größer 1,5 erneut vermessen. Die Signifikanz der Regulierung wurde durch die Anwendung eines Student's t-Test überprüf.

9.2.3 MTT-Assay

Der erstmals von Mosmann (1983) beschriebene MTT-Assay gehört zu den Proliferations- und Vitalitätsassays, welche dazu dienen, den Einfluss von Substanzen und Extrakten auf das Wachstumsverhalten von Zellen zu untersuchen. Dabei werden Lebendzellzahläquivalente bestimmt. Grundlage ist eine Farbreaktion. Bei Zugabe der gelben, wasserlöslichen Verbindung MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid, Thiazolylblau) erfolgt durch die nur in lebenden Zellen aktive mitochondriale Succinatdehydrogenase unter Spaltung der Tetrazolium-Struktur die Bildung eines violetten, wasserunlöslichen Formazans (Abbildung 14). Dieses weist ein breites Absorptionsmaximum bei etwa 550 – 620 nm auf. Es besteht über einen weiten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen der Zahl lebender Zellen und der gemessenen Absorption (Mosmann, 1983).

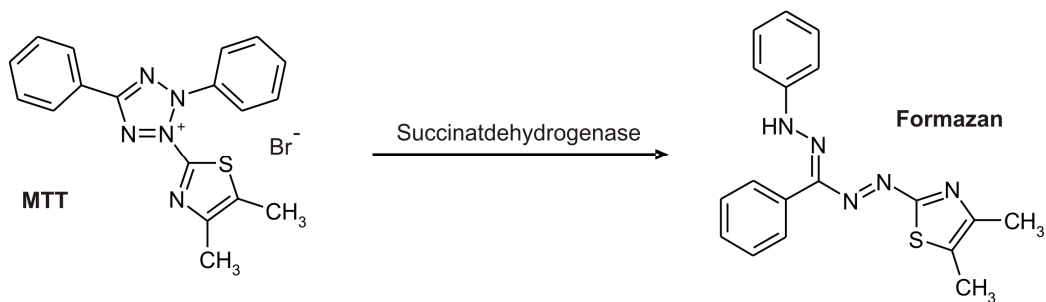


Abbildung 14:
Testprinzip des MTT-Assays (modifiziert nach Roche Diagnostics, 2005).

Die Durchführung des MTT-Assays ist erforderlich, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Luciferase-Reporter-Gen-Assays zu erreichen, da mit steigender Zellzahl auch die Luciferase-Aktivität zunimmt. Somit kann eine Normalisierung der relativen Lichtausbeute auf die MTT-Absorptionswerte und somit indirekt auf die Lebendzellzahl erfolgen.

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den entsprechenden im Luciferase-Reporter-Gen-Assay getesteten Substanzen wurde der MTT-Assay durchgeführt. Dazu wurde eine MTT-Stammlösung (5 mg/ml in PBS) auf eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml mit DMEM ohne

Phenolrotzusatz verdünnt. Dann wurde mit der Mehrkanalpipette die Probenlösung aus den entsprechenden drei *wells* der Mikrotiterplatte abgesaugt und je 100 µl der frisch hergestellten MTT-Lösung zupipettiert. Die unterste (zellfreie) Reihe der Platte wurde analog behandelt, um für die im Anschluss stattfindende photometrische Messung *Blank*-Werte zu erhalten. Nach einer vierstündigen Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden 100 µl einer 20 %igen SDS-Lösung zugegeben. Durch die Zugabe des Tensids wurden sowohl die Zellen lysiert und somit eine weitere Bildung des violetten Formazans verhindert als auch die schon gebildeten Kristalle gelöst. Eine weitere Inkubation über Nacht im Brutschrank stellte eine vollständige Solubilisierung der Formazankristalle sicher. Die Platte wurde zur gleichmäßigen Verteilung des Farbstoffs in den *wells* für einige Minuten auf einem MTP-Schüttler agitiert und anschließend im MTP-Reader bei 544 nm vermessen. Die *Blank*-bereinigten Absorptionswerte (A) wurden zur Berechnung der *fold changes* herangezogen (siehe Kapitel 9.2.2).

10 *Real-Time*-RT-PCR zur Verifizierung der *APOE*-Regulation

10.1 Testprinzip

Zur Untersuchung des Einflusses von Substanzen und Pflanzenextrakten auf die Expression des *APOE*-Gens wurde auch das Verfahren der *Real-Time*-RT-PCR angewendet. Damit ist es möglich, RNA zu quantifizieren, indem diese zuerst in cDNA umgeschrieben wird und im Anschluss daran mittels *Real-Time*-PCR gemessen wird. Die Verwendung eines *One-Step-Kits* (*Brilliant[®] II SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix Kit*, Stratagene) ermöglichte cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation in einem Reaktionsansatz.

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet eine Vervielfältigung von DNA mit Hilfe des hitzestabilen Enzyms *Taq*-DNA-Polymerase statt (Saiki *et al.*, 1988). Dabei wird ein dreistufiges Temperaturprogramm durchlaufen, welches sich aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, dem Anlagern der Primer an den DNA-Einzelstrang (*Annealing*) und der Amplifikation des Genabschnittes (Elongation) zusammensetzt. Bis zu einer bestimmten Zykluszahl sind die Amplifikationseffizienzen konstant: Die DNA-Menge wird bei jedem Zyklus verdoppelt, das heißt die Vervielfältigung der DNA erfolgt exponentiell. Der Prozess der exponentiellen Produktbildung wird jedoch durch verschiedene Parameter begrenzt (Morrison und Gannon, 1994) und geht im Laufe der PCR sogar auf Null zurück. Somit

erreicht die Gesamtmenge des PCR-Produktes einen Plateauwert. Eine Quantifizierung kann nur in der exponentiellen Phase der PCR erfolgen, da hier Rückschlüsse von der DNA-Menge auf die Ausgangsmenge (*template*) möglich sind. Dafür wird der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR[®] Green I* zur Detektion der DNA zu Hilfe genommen. Dieser lagert sich sequenzunspezifisch in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA ein. Die durch Anregung mit blauem Licht ausgelöste Fluoreszenzemission des Farbstoffes ist in gebundenem Zustand weitaus stärker als bei frei vorkommenden Molekülen. Die Intensität emittierten Lichtes ist dabei direkt proportional zur vorhandenen DNA-Menge. Somit kann in jedem Zyklus der *Real-Time*-PCR die Vervielfältigung der DNA direkt durch Fluoreszenzmessung verfolgt werden. Zur Quantifizierung wird das erste deutlich messbare Fluoreszenzsignal verwendet. Dieser Punkt (*threshold crossing point*, c_t -Wert) tritt in einem Bereich auf, in welchem die Reaktion noch exponentiell verläuft.

Bei der Untersuchung der Veränderung der Expression eines Gens wird das Verhältnis der DNA-Mengen zwischen dem Stimulations- und dem Kontrollexperiment (*fold change*) berechnet. Dazu setzt man die Menge des zu bestimmenden Gens ins Verhältnis zu der eines endogenen Referenzgens (*housekeeping gene*). Dieses sollte von Zellen immer in gleichem Maße konstitutiv exprimiert und somit nicht reguliert werden. Man spricht hier von einer relativen Quantifizierung, da keine absolute DNA-Menge bestimmt wird, sondern eine Normalisierung des zu untersuchenden Gens auf das Referenzgen stattfindet (Qiagen, 2004). Die Berechnung wurde nach der von Pfaffl (2001) beschriebenen Methode durchgeführt (siehe Kapitel 10.3).

10.2 Zellstimulation

Hierzu wurden aus der bei der Subkultivierung der Zellen (siehe Kapitel 6) enthaltenen Suspension 50 μ l entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. In eine *6well*-Platte wurden $0,5 \times 10^6$ bzw. 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 2 ml Normalmedium ausgesät und über Nacht im Inkubator gelagert. Zur Zellstimulation wurden die Stammlösungen der Extrakte bzw. der Substanzen in Normalmedium zur entsprechenden Testkonzentration verdünnt (1:100 bzw. 1:1000) und dann zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle diente ein *well*, welches mit dem entsprechenden Lösungsmittel der Substanz bzw. des Extraktes analog behandelt wurde. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Total-RNA isoliert (Kapitel 9.1.5).

10.3 Durchführung der *Real-Time*-RT-PCR

Die Reaktionen wurden im Gerät Mx3000P (Stratagene) mit Hilfe des Reagenzien-Kits *Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit* (Stratagene) durchgeführt. Als *housekeeping gene* wurde *GAPDH* ausgewählt. Für jede Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

1,9	μl	H ₂ O
10,0	μl	PCR-Reaktionsmix (2× <i>Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix</i>)
3,0	μl	Primer-Mix
4,0	μl	<i>template</i> (entsprechend 0,01 μg Total-RNA/μl)
0,3	μl	ROX (verdünnt entsprechend den Angaben des Herstellers)
0,8	μl	RT/RNase Block Enzym Mix

Der Primer-Mix bestand zur Quantifizierung der *APOE*-mRNA aus einer Kombination der Primer ApoE-RT-5-4 und ApoE-RT-3-3, wobei beide Primer in einer Konzentration von 300 nM verwendet wurden. Bei Messung der *GAPDH*-mRNA wurden die Primer *GAPDH_for* und *GAPDH_rev* in den Konzentrationen 75 nM bzw. 300 nM eingesetzt.

Bei jeder Messreihe wurde eine Kontrolle ohne RNA (*No-Template*-Kontrolle, NTC) mitgeführt, die statt der RNA 4 μl H₂O enthielt. Weiterhin wurde eine Kontrolle ohne reverse Transkription (No-RT) mitgeführt, welche 4 μl RNA als *template* enthielt, aber ohne RT/Rnase-Block-Enzym-Mix gemessen wurde. Sie diente zur Prüfung auf Anwesenheit von genomischer DNA die in größeren Mengen das Messergebnis verfälschen kann. Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Programmschritt	Zyklen	Nr.	Temp. [°C]	Zeit [s]	Fluoreszenz-detektion
cDNA-Synthese	1	1	50	1800	
Denaturierung	1	1	95	600	
Amplifizierung	40	1	95	30	
		2	57	60	***
		3	72	30	
Elongation	1	1	72	600	
Schmelzkurve	1	1	95	60	
		2	55	30	
		3	95	30	***

Die Durchführung der Schmelzkurvenanalyse ermöglichte eine Überprüfung der Reinheit des PCR-Produktes. Die Berechnung der *fold changes* mit Normalisierung auf das Referenzgen *GAPDH* wurde mit folgender Gleichung durchgeführt (Pfaffl, 2001):

$$fold\ change = \frac{(Effizienz\ ApoE)^{(\Delta ct\ ApoE\ (Kontrolle-Test))}}{(Effizienz\ GAPDH)^{(\Delta ct\ GAPDH\ (Kontrolle-Test))}}$$

Nach der Durchführung von drei voneinander unabhängigen Experimenten (je ein Duplett pro Substanz, $n = 3$) wurden die Mittelwerte errechnet, und die Signifikanz der Regulierung mittels Student's t-Test überprüft. Die für die Berechnung notwendigen Werte der Effizienzen wurden experimentell ermittelt (siehe Kapitel 17.1) und für *APOE* ein Wert von 2,0207 und für *GAPDH* von 2,113 zugrunde gelegt.

10.4 Validierung der optimalen Primerkonzentration

Die Validierung der optimalen Primerkonzentration wurde für *APOE* und *GAPDH* durchgeführt. Hierzu wurden je drei Konzentrationen (75 nM, 150 nM, 300 nM) des *Forward*- und des *Reverse*-Primers (ApoE-RT-5-4, ApoE-RT-3-3 und GAPDH_for, GAPDH_rev) gegeneinander getestet. Als *template* diente bei allen Ansätzen die gleiche Menge Total-RNA. Als optimale Kombination wurde das Primerpaar ausgewählt, für das bei niedrigem c_t -Wert eine hohe Fluoreszenzintensität gemessen wurde.

10.5 Experimentelle Ermittlung der Effizienzen von *APOE* und *GAPDH*

Da die Berechnung der *fold changes* sich nicht nur auf die Differenz der c_t -Werte stützt, sondern auch die Effizienz der Amplifikation einbezieht, ist es wichtig, diese vorher experimentell zu bestimmen, um grobe Fehler in der Genexpressionsanalyse zu vermeiden. Theoretisch liegt die Effizienz bei 2 (entspricht 100 %), d.h. es findet eine Verdopplung der DNA-Menge bei jedem Zyklus statt. Die Praxis zeigt jedoch, dass die tatsächlichen Effizienzen zwischen 1.6 und 2.1 liegen (Pfaffl, 2003) und Referenz- und Zielgen oft nicht die gleiche Effizienz haben (Liu und Saint, 2002).

Die Effizienz lässt sich in der exponentiellen Phase der PCR anhand folgender Gleichung berechnen (Pfaffl, 2001):

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

Slope steht in diesem Fall für die Steigung einer Geraden, die sich ergibt, wenn man die c_t -Werte (y-Achse) gegen die entsprechende eingesetzte RNA-Mengen (x-Achse) aufträgt. Zur

Bestimmung der Effizienzen wurden fünf verschiedene Total-RNA-Mengen eingesetzt (5 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng und 100 ng) und mit den entsprechenden Primern und im Kapitel 10.3 beschriebenen PCR-Ansatz und -Programm gemessen. Die c_t -Werte wurde an drei unterschiedlichen Tagen jeweils in einem Triplett pro Konzentration bestimmt ($n = 3$).

10.6 Validierung des Testsystems mittels Dibutyryl-cAMP

Zur Validierung des Testsystems wurde Dibutyryl-cAMP verwendet. Dies ist eine Substanz, die in der Literatur als Induktor der *APOE*-Expression beschrieben wird. Cedazo-Mínguez *et al.* (2001a) berichteten von einer induzierten *APOE*-mRNA-Expression in primären Rattenzellen (Astrozyten) nach der Inkubation mit Dibutyryl-cAMP. Auch García *et al.* (1996) beschrieben einen Effekt auf den *APOE*-Promotor durch Dibutyryl-cAMP. Sie führten eine transiente Transfektion von U87-Zellen mit einem Reportergen gekoppelt an die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors durch. Hierbei konnte eine induzierte Expression des Reportergens beobachtet werden.

Für die hier durchgeführten Versuche wurde Dibutyryl-cAMP in der in früheren Arbeiten (Cedazo-Mínguez *et al.*, 2001a) verwendeten Konzentration von 1mM eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 24 h. Es wurden drei unabhängige Zelltests mit unterschiedlichen Zell-Passagen durchgeführt. Die RNA wurde in einem Duplett gemessen.

11 Verifizierung der Aktivität der Extraktfraktionen aus *T. pandacaqui* in einem modifizierten Reportergen-Assay

11.1 Luciferase-Reportergen-Assay mit transient transfizierten Zellen

Ähnlich wie bei dem oben beschriebenen Luciferase-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten Zellen (Kapitel 9.2) kann auch in transient transfizierten Zellen die Beeinflussung eines Promotors durch Substanzen oder Pflanzenextrakte über die Messung der Luciferase-Aktivität bestimmt werden. Da hierbei der in die Zelle eingebrachte Vektor nicht ins Genom integriert wird, ist es nötig, eine Kontrolle bei Messungen mitzuführen: Insbesondere bei Substanzen die Promotor-vermittelt die Genexpression reprimieren, wird es schwer zwischen spezifischen Effekten und solchen zu unterscheiden, die die Zellpopulation

im Ganzen betreffen, wie z.B. Zelltod, wenn nur mit einem Reportergen gearbeitet wird. Deshalb wird neben dem Reportervektor, der sowohl für den zu untersuchenden Promotor als auch für die Luciferase (*Firefly*) kodiert, auch ein Kontrollplasmid co-transfiziert. Dieses kodiert für die Luciferase der gemeinen Seefeder *Renilla reniformis* (kurz: *Renilla*). Die Expression des Kontrollplasmids wird über den Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase-Promotor (HSV-TK-Promotor) gesteuert. Dieser sorgt für eine konstitutive Expression der *Renilla-Luciferase* auf niedrigem Niveau (Promega, 2007). So kann durch Extrakte bzw. Substanzen zwar der zu untersuchende Promotor beeinflusst werden, nicht jedoch der Promotor des Kontrollplasmids. Ist jedoch ein Rückgang bei beiden Luciferase-Aktivitäten nach Inkubation im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten, kann davon ausgegangen werden, dass Ursachen vorliegen, die die gesamte Zellpopulation beeinflussen. Dazu zählen Zelltod, Inhibition von Zellwachstum und unterschiedliche Ausgangszellzahlen (Promega, 2006b). Weiterhin kann es bei der Transfektion der Zellen zu Schwankungen der Transfektionseffizienzen kommen, was falsch-positive Ergebnisse auf Grund von erhöhter Luciferase-Aktivität durch die Aufnahme unterschiedlicher Plasmid-Mengen zur Folge hätte. Auch hier ist die Co-Transfektion des Kontrollplasmids hilfreich, da davon ausgegangen wird, dass beide Plasmide zu gleichen Anteilen in die Zellen aufgenommen werden, und somit eine Erhöhung der Aktivität beider Luciferasen in gleichem Ausmaß erfolgt. Bei den Messungen der zu untersuchenden *wells* werden die Aktivitäten der beiden Luciferasen gemessen und die Werte der *Firefly*-Luciferase auf die der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Mit Hilfe des *Dual-GloTM Luciferase Assay System* (Promega) ist es möglich die Aktivität beider Luciferasen hintereinander in einem Reaktionsgefäß zu messen, da unterschiedliche Substrate und Reaktionsbedingungen zur Bildung von Lumineszenz nötig sind. Im Gegensatz zur *Firefly*-Luciferase benötigt die *Renilla*-Luciferase lediglich die Anwesenheit des Substrates Coelenterazin sowie von Sauerstoff (siehe Abbildung 15).

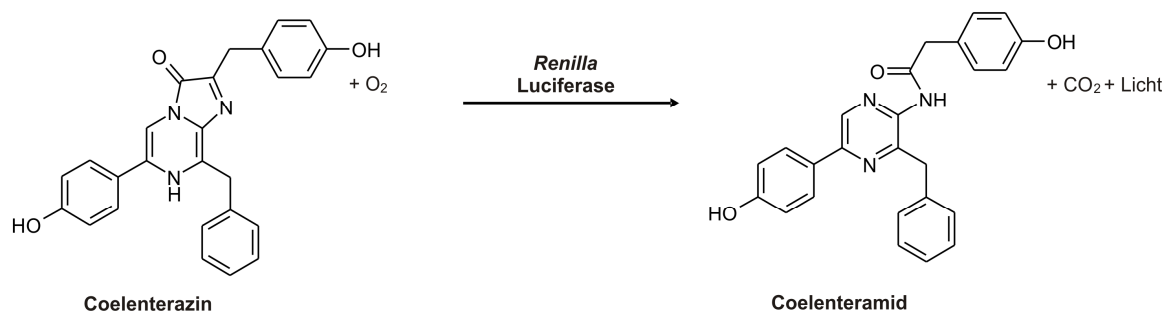


Abbildung 15:
Biolumineszenz-Reaktion, katalysiert durch *Renilla*-Luciferase (modifiziert nach Qiagen, 2006b).

Im Anschluss an die Messung der *Firefly*-Luciferase wird durch die Zugabe des Reagenzes *Dual-GloTM Stop & Glo[®]* das Lumineszenzsignal um mindestens das 10000fache vermindert und das Signal der *Renilla*-Luciferase zur Quantifizierung generiert.

11.2 Durchführung

Für diesen Assay wurden U87-MG-Zellen verwendet. Die Transfektion der Zellen wurde, wie in Kapitel 9.1.1 beschrieben, durchgeführt. Es wurden der für die 5'-regulatorische Region des *APOE* (-1011 bis +400) kodierende Reportervektor pGL4.14-25037 und das Kontrollplasmid pRL-TK zu gleichen Anteilen (je 2 µg Plasmid) eingesetzt. Nach vierstündiger Inkubationszeit mit dem Transfektionsreagenz wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese mit sterilem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen aus der 6well-Mikrotiterplatte wurden diese mit 500 µl Trypsin/EDTA für 2 min bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Im Anschluss daran wurden 500 µl Normalmedium (U87-MG) hinzugegeben, um die Trypsinwirkung zu inaktivieren. Die erhaltene Zellsuspension wurde nun in ein Reaktionsgefäß (2 ml) überführt und bei 400 × g für 3 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in etwas Normalmedium resuspendiert und zur Aussaat auf 0,5 × 10⁶ Zellen pro 9 ml Normalmedium verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden nun 180 µl (entsprechend 1 × 10⁴ Zellen) pro well einer 96well-Mikrotiterplatte ausgesät. Auch hier wurden analog zum Luciferase-Assay mit stabil transfizierten Zellen die wells der äußeren Reihe nur mit 200 µl PBS befüllt.

Zur nun folgenden Inkubation der Zellen mit Substanzen und Pflanzenextrakten wurden die entsprechenden Arbeitslösungen, wie im Kapitel 9.2.2 beschrieben, hergestellt und davon je 20 µl/well eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,1 % eingesetzt. Es wurden pro Substanz drei wells für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurde mit einer Mehrkanalpipette das überstehende Medium abgesaugt und durch 50 µl Assay-Medium (DMEM ohne Phenolrotzusatz) ersetzt. Im Anschluss fand eine Messung sowohl der Aktivität der *Firefly*-Luciferase als auch der *Renilla*-Luciferase mit Hilfe des *Dual-GloTM Luciferase Assay System* (Promega) im MTP-Reader FLUOStar Galaxy in einer LUMITRAC[®] 200 96well-MTP nach Angaben des Herstellers statt. Zur Blank-Bereinigung der einzelnen Messwerte wurden auch hier wieder drei Messungen mit Assay-Medium durchgeführt, der Mittelwert (Angabe in RLU) gebildet und von den erhaltenen Messwerten der Proben abgezogen. Dies wurde für beide Luciferasen durchgeführt. Zur Auswertung erfolgte die Berechnung der *fold changes* unter

Normalisierung der Messwerte der *Firefly*-Luciferase auf die der *Renilla*-Luciferase nach folgender Gleichung:

$$\text{fold change} = \frac{(RLU(\text{Firefly})_{\text{Test}} / RLU(\text{Renilla})_{\text{Test}})}{(RLU(\text{Firefly})_{\text{DMSO}} / RLU(\text{Renilla})_{\text{DMSO}})} \quad \begin{array}{l} \text{RLU} = \text{relative Lichtausbeute} \\ \text{(relative light units)} \end{array}$$

Es wurden je drei unabhängige Messungen in einem Triplet durchgeföhrt (n = 3).

12 Molekulargenetische Identitätsprüfung – Sequenzanalyse der ITS-Region von *T. pandacacqui*

Das getrocknete Drogenmaterial der Pflanze *Tabernaemontana pandacacqui* LAM, das in dieser Arbeit als Ausgangsmaterial zur aktivitätsgeleiteten Fraktionierung eines Pflanzenextraktes diente, wurde einer molekulargenetischen Identitätsprüfung, basierend auf der Sequenzanalyse der ITS-Region, unterzogen. Im Zuge der Wildsammlung des Drogenausgangsmaterials im Inselstaat Vanuatu wurde die Identität der Pflanze sowohl vor Ort im National Herbarium in Port Vila (Vanuatu) als auch in den Royal Botanic Gardens (Kew, London, Großbritannien) bestimmt (Bradacs, 2008a). Die ITS-Sequenzanalyse hat den Vorteil, dass bei nachfolgender Ernte bzw. Lieferung des Drogenmaterials eine schnelle und eindeutige Identifizierung möglich ist.

Die ITS-Region ist Bestandteil des 18S-5,8S-26S-rDNA-Clusters, welches für drei der vier in eukaryotischen zytoplasmatischen Ribosomen vorkommenden nukleären ribosomalen RNAs (nrRNA) kodiert. Sie setzt sich aus den beiden nicht-kodierenden Abschnitten ITS1 und ITS2 zusammen, die das 5,8S-rRNA-Gen einschließen. Diese weisen artspezifische Sequenzmuster auf und erlauben somit eine sehr genaue Identifizierung vorhandenen Drogenmaterials sowie phylogenetische Zuordnungen (Kersten *et al.*, 2008). Flankiert wird die ITS-Region durch die Gene 18S und 28S (siehe Abbildung16).

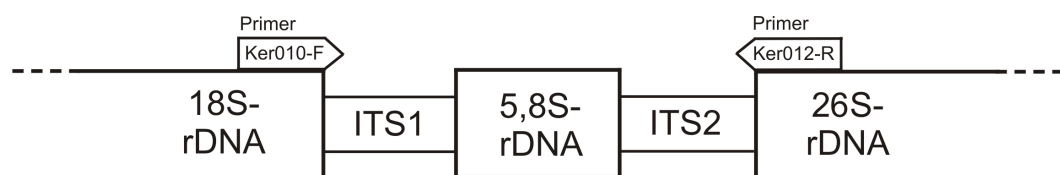


Abbildung 16:

Schematische Darstellung der ITS-Region sowie der Bindungsstellen der verwendeten Primer (modifiziert nach Baldwin *et al.*, 1995).

Da diese flankierenden Bereiche (18S- und 26S-rRNA-Gen) hoch konserviert sind, ist es durch den Einsatz universeller Primer möglich, die ITS-Region mit genomischer DNA als Matrize zu amplifizieren. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer Ker010-F und Ker012-R wurden freundlicherweise von PD Dr. Werner Knöb (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn) zur Verfügung gestellt.

12.1 Isolierung genomischer DNA aus getrocknetem Pflanzenmaterial

Die getrocknete Droge wurde unter Zugabe von Seesand in einer Reibschale zerkleinert. Aus 50 mg des Drogenpulvers erfolgte die Gewinnung genomischer DNA mit Hilfe des *DNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß der beigelegten Gebrauchsanleitung (*DNeasy Plant Handbook*, Version Juli 2006). Die nach Elution mit 80 µl Wasser erhaltene DNA wurde durch Ethanolfällung gereinigt, in 50 µl low-TE-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

12.2 Amplifizierung und Sequenzierung der ITS-Region

Die Amplifizierung der kompletten ITS1-5.8SRNA-ITS2-Region erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem PCR-Ansatz und -Programm:

PCR-Ansatz:

0,5	µl	Taq-Polymerase
5,0	µl	10× Reaktionspuffer
1,0	µl	DNA
0,25	µl	Ker010-F
0,25	µl	Ker012-R
5,0	µl	dNTPs (2 mM)
38,0	µl	H ₂ O

Programmschritt	Zyklen	Nr.	Temp. [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	1	1	95	180
Amplifizierung	39	1	95	30
		2	59	30
		3	72	60
Elongation	1	1	72	600

Die erhaltenen Amplifikate wurden auf einem 1 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht entsprechende Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und daraus die DNA mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) gemäß Handbuch (*QIAquick Spin Handbook*, Version Juli 2002) extrahiert. Die nach Elution mit 60 µl Wasser erhaltene DNA wurde durch Ethanolfällung gereinigt und bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierung von je 200 ng im SpeedVac-Evaporator getrockneter DNA erfolgte bei Eurofins MWG Operon (Martinsried) in einem DNA-Kapillarsequencer in beiden Richtungen unter Verwendung der Primer Ker010-F und Ker012-R. Abschließend wurde die ermittelte

ITS-Sequenz mit anderen Sequenzen mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verglichen.

13 Phytochemische Methoden

13.1 Gewinnung von Extrakten aus TCM-Drogen

Die getrockneten Drogen wurden zur Extraktion in einer Zentrifugalmühle auf eine Korngröße von 1,5 mm zerkleinert.

Wässrige Extraktion (klassisch nach TCM)

Zur wässrigen Extraktion wurden 20 g gemahlene Droge kurz in 300 ml Wasser eingeweicht, aufgekocht und für 20 min am Kochen gehalten. Gegebenenfalls wurde Wasser ergänzt, da die Droge stets mit Wasser bedeckt sein sollte. Diese Extraktion entspricht der vorgeschriebenen Zubereitung der Drogen in der Traditionellen Chinesischen Medizin (vgl. Hempen und Fischer, 2007). Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurde dieser bei $3300 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt, der Drogenrückstand erneut mit 300 ml Wasser für 30 min gekocht und nach dem Abkühlen zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Die getrockneten Extrakte wurden in luftdichte Gläschen überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Methanolische Extraktion

Der Gewinnung des methanolischen Extraktes wurde eine Entfettung der Droge mit Petrolether und eine Extraktion mit Chloroform vorangestellt. Zur Entfettung wurden 10/20 g Droge mit 100/200 ml Petrolether versetzt, für 24 h geschüttelt, über einen Faltenfilter filtriert und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde die entfettete Droge in 100/200 ml Chloroform resuspendiert und erneut für 24 h geschüttelt und danach filtriert. Der Drogenrückstand wurde nachfolgend noch zweimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingengt, in etwas Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Sie wurden nicht zur Zelltestung eingesetzt.

Der Drogenrückstand wurde nun mit 100/200 ml Methanol analog zur Extraktion mit Chloroform behandelt. Die vereinigten Extrakte wurden nach dem Gefriertrocknen in luftdichte Gläschen überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

13.2 Gewinnungen von Extrakten aus *T. pandacaqui* mittels beschleunigter Lösungsmittlextraktion (ASE)

Die Extrakte der Pflanze *T. pandacaqui* wurden durch beschleunigte Lösungsmittlextraktion (*accelerated solvent extraction*, ASE) unter Verwendung der Dionex ASE® 100-Anlage hergestellt.

Für die Extraktion wurde das geschnittene und getrocknete Drogenmaterial in einer Zentrifugalmühle auf eine Korngröße von 0,5 mm zerkleinert. Es wurden 30 g zerkleinerte Droge mit 10 g Seesand versetzt und in Extraktionskartuschen mit einem Volumen von 100 ml eingefüllt. Extrahiert wurde nacheinander mit Dichlormethan, Ethylacetat und Methanol. So war es möglich drei verschiedene Extrakte desselben Drogenmaterials zu erhalten, welche sich in der Lipophilie der Inhaltsstoffe unterscheiden.

Einwaage:	40 g Droge-Seesand-Mischung (3:1)
Druck:	120 bar
Temperatur:	50 °C
Heizzeit:	5 min
Extraktionsprofil:	Dichlormethan → Ethylacetat → Methanol
Flush:	60 %
Purge (mit N ₂):	200 s

Aus den Extraktlösungen wurde am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (Wasserbadtemperatur max. 40 °C). Die getrockneten Extrakte wurden in luftdichte Gläschen überführt und bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung des Inhaltsstoffmusters wurden DC-Untersuchungen durchgeführt.

13.3 Isolierung der Alkaloidfraktion aus *T. pandacaqui*

Die Isolierung der Alkaloidfraktion wurde aus dem Dichlormethanextrakt des Drogenmaterials der Pflanze *T. pandacaqui* (Kapitel 13.2) vorgenommen. Ein Abtrennen der Alkaloide von den übrigen Extraktkomponenten fand nach dem Prinzip der Säure-Base-Extraktion statt. Die Isolierung wurde in Anlehnung an Chaturvedula *et al.* (2003) durchgeführt.

Hierfür wurden 5,0 g Dichlormethanextrakt in 50 ml Dichlormethan gelöst. In einem Scheidetrichter wurde dreimal gegen 100 ml Essigsäure (5 % V/V) ausgeschüttelt und jeweils

im Anschluss daran die Phasen getrennt. Die DCM-Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingeeengt, in ein luftdichtes Gläschen überführt und bei -80 °C gelagert. Da in einem sauren Milieu eine Protonierung des Stickstoffs stattfindet, waren die Alkaloide aufgrund einer geänderten Löslichkeit in der wässrigen Phase anzutreffen. Um eine Abtrennung der Alkaloide von ebenso in die wässrige Phase übergegangenen Extraktkomponenten zu erreichen, wurde nun der pH-Wert durch Zugabe von Ammoniak auf pH = 9 angehoben. Dadurch fand erneut eine Veränderung der Löslichkeit der Alkaloide statt (Deprotonierung des Stickstoffs aufgrund der pH-Wert-Änderung). Somit war es möglich, durch viermaliges Ausschütteln im Scheidetrichter gegen Dichlormethan (je 200 ml) die Alkaloide von den übrigen, nicht deprotonierbaren Extraktkomponenten zu isolieren, und in der DCM-Phase anzureichern. Die Alkaloid-Fraktion (DCM-Phase) wurde mittels Dünnschichtchromatographie im Fließmittelsystem DC 4 (siehe Kapitel 13.4.1) untersucht und die DC-Platten mit Dragendorff-Reagenz und Anisaldehyd besprüht. Zur Lagerung wurde die erhaltene DCM-Phase am Rotationsverdampfer eingeeengt, in ein luftdichtes Gläschen überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

13.4 Chromatographische Methoden

13.4.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden folgende Fließmittelsysteme verwendet:

- DC 1: Aceton-H₂O-Ammoniak 25 % (90-7-3)
- DC 2: Toluol-Ethylacetat (95-5)
- DC 3: Ethylacetat-Ethylmethylketon-H₂O-Ameisensäure (5-3-1-1)
- DC 4: Dichlormethan-Methanol (15-1)

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte anhand der Eigenfärbung einiger Verbindungen, unter der UV-Lampe und nach Besprühen der DC-Platte mit den nachfolgend aufgeführten Sprühreagenzien. Um Banden sichtbar zu machen, wurde die DC-Platte nach dem Besprühen mit Anisaldehyd für einige Minuten auf einer Heizplatte bei 100 °C erwärmt. Naturstoffreagenz und Macrogol 400 wurden in Kombination verwendet.

Zusammensetzung der verwendeten Sprühreagenzien

Anisaldehyd-Reagenz	Anisaldehyd	0,5	ml
	Essigsäure 99 %	10	ml
	Methanol	85	ml
	Schwefelsäure, konz.	5	ml
Dragendorff-Reagenz (Stammlösung)	Basisches Bismutcarbonat	2,6	g
	Natriumiodid	7	g
	Essigsäure 99 %	25	ml
	zum Sieden erhitzen, filtrieren		
Dragendorff-Reagenz (Arbeitslösung)	Filtrat	20	ml
	Ethylacetat	80	ml
	Stammlösung	10	ml
	Essigsäure 99 %	20	ml
Macrogl 400	Ethylacetat	40	ml
	Polyethylenglycol 400	50	g
	Methanol	1	l
Naturstoff-Reagenz	Diphenylborylethylamin	10	g
	Methanol	1	l

13.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die präparativen Isolierungen erfolgten mit einem Fluss von 10 ml/min an der C18-Säule Eurospher 100-7 unter Verwendung der HPLC-Anlage Varian Prostar. Vor der Probenaufgabe wurde die im Fließmittel gelöste Fraktion durch den Filter Minisart (Porengröße 0,2 µm) filtriert.

HPLC der Fraktion E3

Die Trennung erfolgte mit folgenden Fließmitteln:

Gradient: Methanol – H₂O

Methanol – H₂O 70 – 30 (0 min) → Methanol – H₂O 70 – 30 (8 min) →

Methanol – H₂O 100 – 0 (40 min) → Methanol – H₂O 100 – 0 (45 min)

HPLC der Fraktion G6

Die Trennung erfolgte mit folgenden Fließmitteln:

Gradient: Methanol – H₂O

Methanol – H₂O 80 – 20 (0 min) → Methanol – H₂O 85 – 15 (10 min) →

Methanol – H₂O 85 – 15 (20 min) → Methanol – H₂O 88,33 – 11,67 (25 min)

13.4.3 Säulenchromatographie

13.4.3.1 Adsorptionschromatographie

Die Trennungen erfolgten an Kieselgel Geduran Si 60 (63-200 μm) in gefüllten Glassäulen.

Kieselgel-Vakuumsäule

Für die Vakuumsäule (Innendurchmesser 4,5 cm) wurden 150 g Kieselgel verwendet. Es wurden zehn verschiedene Fließmittelzusammensetzungen gewählt, von denen je 2×150 ml auf die Säule gegeben wurden. Anschließend wurde dem System über eine Wasserstrahlpumpe Luft entzogen und die Fraktionen gesammelt. Folgende Fließmittelzusammensetzungen wurden verwendet:

- VS 1: Hexan
- VS 2: Hexan-Dichlormethan (3-1)
- VS 3: Hexan-Dichlormethan (1-1)
- VS 4: Hexan-Dichlormethan (1-3)
- VS 5: Dichlormethan
- VS 6: Dichlormethan-Methanol (3-1)
- VS 7: Dichlormethan-Methanol (1-1)
- VS 8: Dichlormethan-Methanol (1-3)
- VS 9: Methanol
- VS 10: Aceton-H₂O-Ammoniak 25 % (90-7-3)

Die Fraktionen der Fließmittel VS 1 – VS 7 wurden mit dem DC-Fließmittel DC 4 (Kapitel 13.4.1) untersucht, wohingegen bei VS 7 – VS 10 das Fließmittel DC 1 (Kapitel 13.4.1) verwendet wurde. Alle DCs wurden mit Dragendorff-Reagenz, Naturstoffreagenz und Anisaldehyd besprüht. Eine Vereinigung von Fraktionen fand nach Betrachtung der DCs statt.

Kieselgelsäule

Die Glassäule (Länge: 40 cm, Innendurchmesser: 5 cm) wurde mit 190 g Kieselgel befüllt. Die effektive Laufstrecke betrug 31 cm. Folgende Fließmittelkombinationen wurden verwendet:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------|
| KG 1: Dichlormethan-Methanol (15-1) | Fraktionen 1-49 |
| KG 2: Dichlormethan-Methanol (15-2) | Fraktionen 50-86 |
| KG 3: Dichlormethan-Methanol (15-3) | Fraktionen 87-127 |
| KG 4: Methanol | Fraktionen 128-150 |

Nach dem Entgasen der Lösungsmittel wurde das Kieselgel in einer adäquaten Menge KG 1 aufgeschlämmt und die Säule vorsichtig befüllt. Die zu untersuchende Fraktion wurde ebenfalls in KG 1 gelöst und auf die Säule aufgebracht. Die erhaltenen Fraktionen wurden

mittels DC untersucht (Fließmittel DC 4, Kapitel 13.4.1), die Chromatogramme mit Anisaldehyd besprüht und Fraktionen ähnlicher Zusammensetzung vereinigt.

13.4.3.2 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration an Sephadex[®] LH-20 wurde als offene Säulenchromatographie in einer Glassäule (Länge 60 cm, Durchmesser 1,5 cm) durchgeführt. Hierzu wurden 24,5 g Sephadex[®] LH-20 für 24 h in Methanol vorgequollen und anschließend in die Säule gefüllt. Als Fließmittel wurde Methanol verwendet. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels DC (Fließmittel DC 4, Kapitel 13.4.1) untersucht und Fraktionen ähnlicher Zusammensetzung vereinigt. Auch hier wurde als Sprühreagenz Anisaldehyd verwendet.

Ergebnisse

Das *Apolipoprotein-E*-Gen ist bislang der einzige genetische Risikofaktor, der mit einer Erkrankung an der sporadischen Form der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht werden konnte. Neben der Beeinflussung von A β -Ablagerungen und der Bildung neurofibrillärer Bündel kann ApoE auch mit der bei AD vorkommenden Lipid-Dysfunktion, dem Verlust synaptischer Plastizität, der cholinergen Dysfunktion und der Unterbrechung von Signalwegen assoziiert werden (Cedazo-Mínguez, 2007). Nicht nur das *APOE* ϵ 4-Allel, sondern auch erhöhte Plasmaspiegel des Proteins selbst spielen eine Rolle in der Pathogenese der Krankheit. Taddei *et al.* (1997) berichteten von einer *APOE* ϵ 4-unabhängigen signifikanten Erhöhung des Plasmaspiegels des ApoE-Proteins. Eine erhöhte *APOE*-Expression konnte auch durch neuere Studien im frontalen und temporalen Cortex und im Hippocampus gezeigt werden. Die Expression des ApoE-Proteins kann durch Polymorphismen in der 5'-regulatorischen Region des Promotors wesentlich beeinflusst werden. *In-Vitro*-Versuche zeigten bereits, dass die vier vorkommenden Promotorpolymorphismen (-491A/T, -427T/C, -219T/G und +113G/C) sich hinsichtlich der Aktivität des Promotors unterscheiden (siehe Artiga *et al.*, 1998a). So ist es denkbar, dass erhöhte ApoE-Spiegel, unter anderem verursacht durch Veränderungen in der Expression, in Kombination mit dem Genotyp *APOE* ϵ 4 das Risiko für eine AD-Erkrankung synergistisch erhöhen (Laws *et al.* 2003). Ziel dieser Arbeit war es daher, einen Assay zur Untersuchung der Expression des *APOE*-Gens auf RNA-Ebene zu entwickeln. Neben der Quantifizierung der mRNA mittels *Real-Time*-RT-PCR wurden auch Luciferase-Reporter-Gen-Assays mit stabil und transient transfizierten Astrozytom- und Glioblastom-Zellen durchgeführt. Mit diesen Assays sollte dann ein Screening nach Substanzen bzw. Pflanzenextrakten ermöglicht werden, die die Expression des *APOE*-Gens modulieren.

14 Genetische Polymorphismen im *APOE*-Gen der Astrozytom-zelllinie 1321N1

Polymorphismen, die das Risiko an einer Alzheimer Demenz zu erkranken beeinflussen, sind sowohl in der kodierenden Region des *APOE*-Gens als auch in der 5'-regulatorischen Region des Promotors zu finden. So können die Protein-Isoform (ApoE2, ApoE3 oder ApoE4) und

der Grad der Expression Einfluss auf die Pathogenese der Krankheit nehmen. Im Vorfeld der Entwicklung eines zellbasierten Assays wurde die verwendete Astrozytomzelllinie 1321N1 hinsichtlich dieser Polymorphismen genauer charakterisiert. Neben der Analyse der Polymorphismen in der *APOE*-Promotorregion durch Sequenzierung wurde auch der Genotyp bezüglich der vorliegenden Protein-Isoformen durch *Real-Time*-PCR sowie Sequenzierung bestimmt.

14.1 Kodierende Region des *APOE*-Gens

14.1.1 Sequenzierung

Das Apolipoprotein E kommt beim Menschen hauptsächlich in den Isoformen ApoE2, ApoE3 und ApoE4 vor. Diese unterscheiden sich, wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, durch einen Aminosäureaustausch an den Positionen 112 und 158 der Aminosäuresequenz. Verantwortlich für den Austausch sind Polymorphismen an den Positionen 3937 und 4075 der Basensequenz (Kurtz *et al.*, 2004, Abbildung 17).

3937	4075	Allel
C	T	<i>APOE</i> _ε x
T	T	<i>APOE</i> _ε 2
T	C	<i>APOE</i> _ε 3
C	C	<i>APOE</i> _ε 4

Abbildung 17:

Allel-bestimmende SNPs in der Basensequenz der kodierenden Region des *APOE*-Gens (schematisch)

Schematische Gegenüberstellung der Allel-bestimmenden SNPs der Hauptisoformen *APOE*_ε2, *APOE*_ε3 und *APOE*_ε4. Die Isoform *APOE*_εx ist beim Menschen nicht anzutreffen und diente bei der *Real-Time*-PCR als Negativkontrolle (modifiziert nach Kurtz *et al.*, 2004).

In Abbildung 17 sind die Allel-bestimmenden SNPs in der Basenpaarsequenz der *APOE*-Isoformen schematisch dargestellt. Man kann erkennen, dass sich *APOE*_ε2 und *APOE*_ε4 jeweils nur durch einen Basenaustausch an den Positionen 3937 bzw. 4075 von der Hauptisoform *APOE*_ε3 unterscheiden.

Um nun die Allele (*APOE*_ε2, *APOE*_ε3 und *APOE*_ε4) der 1321N1-Zellen durch Sequenzierung eines PCR-Produkts bestimmen zu können, wurde der entsprechende Genabschnitt, wie in Kapitel 7.1.1 beschrieben, amplifiziert und anschließend eine Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurde genomische DNA aus Zellen der Zellkultur eingesetzt. Da durch einfache PCR keine Trennung der Allele erfolgt, sondern beide amplifiziert werden, zeigt sich eine Homogenität der Allele bei der Sequenzierung eines PCR-Produkts in einem Peak einer Basenposition und eine Heterogenität in einem Doppelpeak

zweier Basen. Bei der Betrachtung der erhaltenen Sequenz konnte festgestellt werden, dass an beiden Allel-bestimmenden Positionen (3937 und 4075) eine Heterogenität der Allele vorzufinden war.

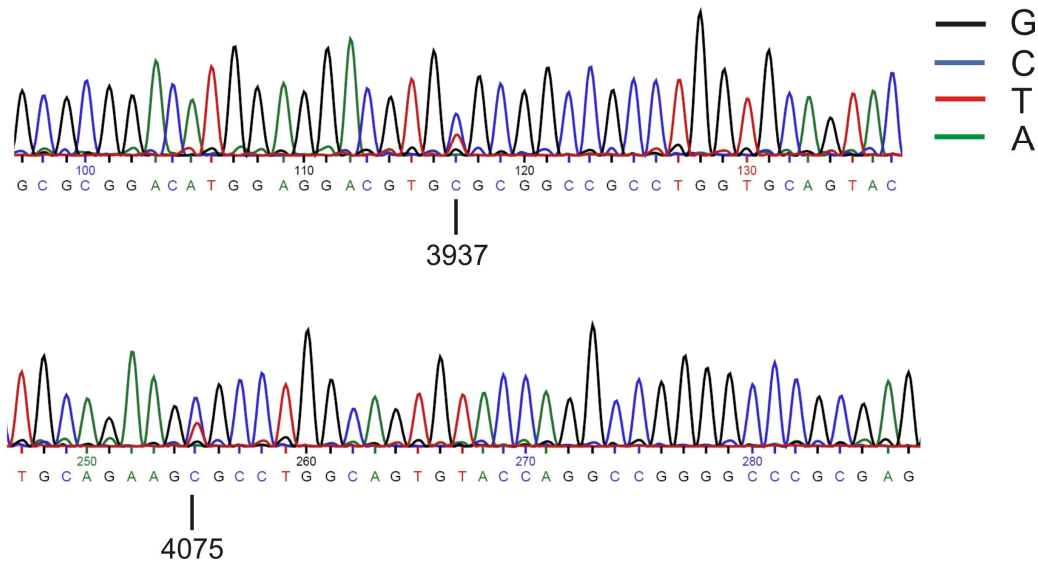


Abbildung 18:

SNPs in der kodierenden Region des *APOE*-Gens der 1321N1-Zellen

Ergebnis der Sequenzierung eines PCR-Produkts des *APOE*-Gens der 1321N1-Zellen (amplifiziert an genomischer DNA) bezüglich der Punktmutationen der Allel-bestimmenden Positionen 3937 und 4075. Beide Positionen zeigen die Basen T und C und somit ist ein Rückschluss auf den Genotyp *APOE*ε2/ε4 der 1321N1-Zellen möglich.

Sowohl bei Position 3937 als auch bei 4075 zeigte sich ein Doppelpeak der Basen C und T (Abbildung 18). Das Allel *APOE*ε2 würde an Position 3937 und 4075 die Base T aufweisen, *APOE*ε4 hätte an beiden Positionen die Base C und *APOE*ε3 hätte eine Kombination aus T an Position 3937 und C an Position 4075 (Kurtz *et al.* 2004, Abbildung 17). Somit konnte für die 1321N1-Zellen der Genotyp *APOE*ε2/ε4 bestimmt werden, da nur diese Allel-Kombination die Doppelpeaks der Sequenzierung erklären kann. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, wurde das oben erhaltene PCR-Produkt in den Vektor pGEM[®]-T (Promega) kloniert, in *E.coli* transformiert und im Anschluss daran die Plasmid-DNA von 20 Bakterienklonen isoliert. Die Sequenzierung der Plasmid-DNA der Klone 1 und 4 bestätigte den Genotyp *APOE*ε2/ε4 der 1321N1-Zellen, da der Plasmid-DNA des Klons 1 das *APOE*ε4-Allel und der Plasmid-DNA des Klons 4 das *APOE*ε2-Allel zugeordnet werden konnte.

14.1.2 *Real-Time-PCR*

Als alternative gendiagnostische Methode wurde zur Diskriminierung der *APOE*-Allele ein *Real-Time-PCR*-Test etabliert. Zur Genotypisierung der 1321N1-Zellen wurden *Real-Time-PCR*-Messungen nach der in Kapitel 7.1.2 beschriebenen Methode mit entsprechender Plasmid-DNA (Kapitel 14.1.1) durchgeführt. Die Detektion der SNPs war auf diesem Weg möglich, da eine *Real-Time-PCR* mit dem Allel-entsprechenden Primerpaar einen weitaus niedrigeren c_t -Wert ergibt als mit den übrigen Primerpaaren. Denn nur hier liegt eine komplette Übereinstimmung zwischen Sequenz der DNA und der Primer vor und somit sind die Voraussetzungen für eine effizientere Amplifikation der DNA gegeben. Folgende Primerkombinationen wurden verwendet:

*APOE*ε2: ApoE3-rt-5-1 und ApoE2-rt-3-1 (Detektion Position 3937 T und 4075 T)

*APOE*ε3: ApoE3-rt-5-1 und ApoE4-rt-3-1 (Detektion Position 3937 T und 4075 C)

*APOE*ε4: ApoE4-rt-5-1 und ApoE4-rt-3-1 (Detektion Position 3937 C und 4075 C)

*APOE*εx: ApoE4-rt-5-1 und ApoE2-rt-3-1 (Detektion Position 3937 C und 4075 T)

Das Primerpaar *APOE*εx konnte als Negativkontrolle verwendet werden. Da dieses Allel in der Natur nicht vorkommt (Kurtz *et al.* 2004), repräsentiert der c_t -Wert dieses Ansatzes ein nicht passendes Primerpaar. Somit liegen c_t -Werte von Ansätzen mit nicht passenden Primerkombinationen in Nähe des Wertes des *APOE*εx-Paares, während der Ansatz des Allel-entsprechenden Primerpaares einen niedrigeren c_t -Wert aufweist. Zur Kontrolle der Methode wurde die DNA des Plasmids pOTB7ApoE3, welches für *APOE*ε3 kodiert, gegen die Primerpaare für *APOE*εx, *APOE*ε2, *APOE*ε3 und *APOE*ε4 getestet. Man konnte erkennen, dass der c_t -Wert des *APOE*ε3-Primerpaares mit 16,89 weitaus niedriger war als bei den anderen Primerkombinationen. Für *APOE*εx konnte in der durchgeführten Zyklenanzahl der Fluoreszenzwert des Hintergrundrauschens nicht überschritten werden, *APOE*ε2 resultierte in einem c_t -Wert von 27,35 und *APOE*ε4 von 24,48. Somit konnte über die Methode *Real-Time-PCR* eine korrekte Aussage bezüglich des Haplotyps des im Plasmid vorliegenden *APOE*-Genabschnitts getroffen werden.

Die Vermessung der Plasmid-DNA von vier Klonen zeigte, dass in den 1321N1-Zellen die Allele *APOE*ε2 und *APOE*ε4 vorzufinden sind. Betrachtet man Abbildung 19, so ist deutlich zu erkennen, dass mit der Plasmid-DNA aus Klon 2 die Verwendung des Primerpaares für das *APOE*ε2-Allel in einem weitaus niedrigeren c_t -Wert resultierte als dies für die übrigen Primerpaare der Fall war. Die Allel-Negativkontrolle (*APOE*εx) ergab einen c_t -Wert von

34,33 und die Ansätze der im Plasmid nicht vorliegenden Allele *APOE*ε3 und *APOE*ε4 lagen mit Werten von 35,93 und 38,99 annähernd im Bereich der Negativkontrolle. Mit einem c_t -Wert von 21,40 konnte Klon 2 das Allel *APOE*ε2 eindeutig zugewiesen werden. Ebenso ist in Abbildung 19 zu erkennen, dass der aus Klon 3 gewonnenen Plasmid-DNA das Allel *APOE*ε4 zugeordnet werden konnte. Die c_t -Werte der Ansätze der Negativkontrolle (Primerpaar für *APOE*εx) und die dem Allel nicht entsprechenden Primerpaare (*APOE*ε2 und *APOE*ε3) lagen zwischen 32,47 und 37,79, während sich für den Ansatz des Primerpaares *APOE*ε4 ein c_t -Wert von 18,89 ergab. Analoge Ergebnisse wurden für die Klone 1 und 4 erhalten. Anhand der c_t -Werte konnte für Klon 1 das Allel *APOE*ε4 und Klon 4 das Allel *APOE*ε2 ermittelt werden. Die exakten c_t -Werte der vermessenen Plasmid-DNA der vier Klone als auch der Methodenkontrolle (Plasmid pOTB7ApoE3) sind im Anhang in Tabelle A1 dargestellt.

Die Richtigkeit dieser Aussagen konnte durch den Vergleich mit der in Kapitel 14.1.1 durchgeführten Sequenzierung der Plasmid-DNA der Klone 1 und 4 bestätigt werden. Anhand beider Methoden konnte der DNA des Klon 1 das *APOE*ε4-Allel und der des Klon 4 das *APOE*ε2-Allel zugeordnet werden.

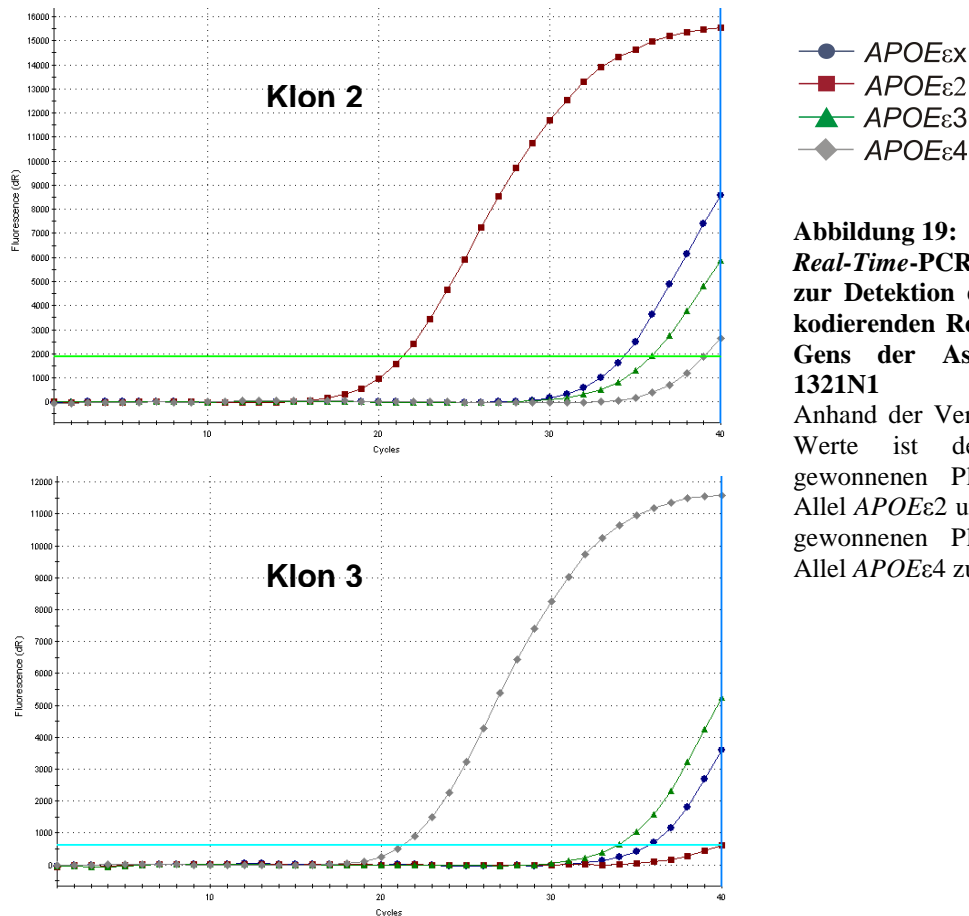


Abbildung 19:
Real-Time-PCR (Klon 2 und 3)
zur Detektion der SNPs in der
kodierenden Region des *APOE*-
Gens der Astrozytomzelllinie
1321N1

Anhand der Verschiebung der c_t -Werte ist der aus Klon 2 gewonnenen Plasmid-DNA das Allel *APOE*ε2 und der aus Klon 3 gewonnenen Plasmid-DNA das Allel *APOE*ε4 zuzuordnen.

14.2 Polymorphismen in der *APOE*-Promotorregion

Zur Charakterisierung der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors in 1321N1-Zellen wurden diese hinsichtlich der bei Artiga *et al.* (1998a) beschriebenen Punktmutationen an den Positionen -491, -427, -219 und +113 untersucht. Hierfür wurde genomische DNA aus Zellen der Zellkultur gewonnen und die zu untersuchende Genregion mittels PCR amplifiziert. Das gewonnene PCR-Produkt wurde nach Aufreinigung sequenziert (siehe Kapitel 7.2). Das Ergebnis ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5:

Ergebnis der Genotypisierung der 1321N1-Zellen bezüglich der Punktmutationen in der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors

Position	Genotyp
-491	AT
-427	TT
-219	TG
+113	GG

Für die Positionen -427 (Genotyp TT) und +113 (Genotyp GG) konnte eine Homogenität der Allele festgestellt werden. Die Sequenzierung zeigte deutlich, dass sich an den Positionen -491 und -219 zwei verschiedene Allele im Genom der 1321N1-Zellen befinden (Abbildung 20).

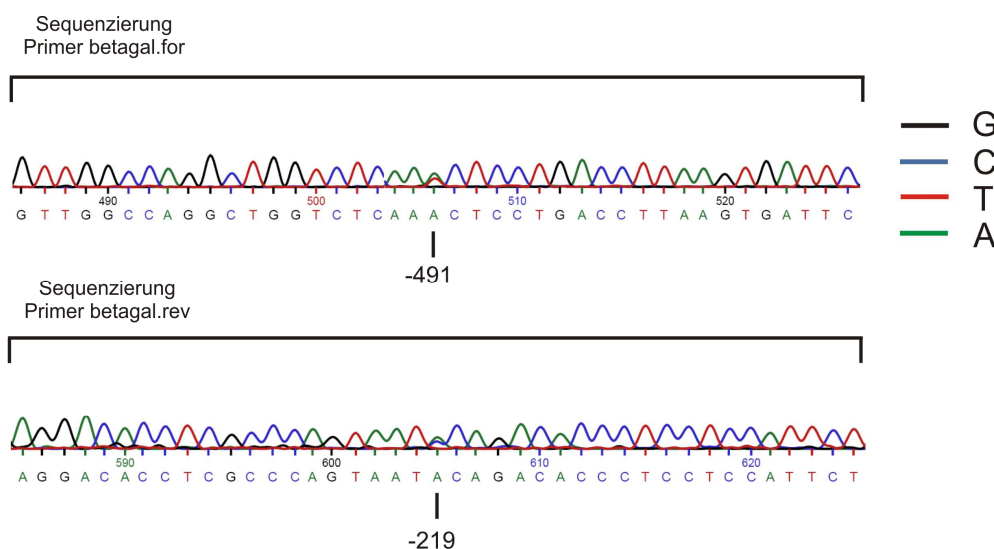


Abbildung 20:

Polymorphismen in der *APOE*-Promotorregion der 1321N1-Zellen

Ergebnis der Sequenzierung eines PCR-Produkts der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors bezüglich der Punktmutationen der Positionen -491 und -219. Als Matrize für die PCR diente genomische DNA. Die Sequenzierung ergab an Position -491 den Genotyp AT und an Position -219 den Genotyp TG.

Für die Position -491 konnte durch die Sequenzierung des PCR-Produkts mit dem Primer betagal.for der Genotyp AT bestimmt werden. Da mit dem Primer betagal.rev das PCR-Fragment vom 3'-Ende aus sequenziert wurde, musste zur Bestimmung des Genotyps an Position -219 die komplementäre Base der erhaltenen Sequenz herangezogen werden. In Abbildung 20 sind an Position -219 die Basen A und C zu erkennen, somit lag in der ursprünglichen Sequenz der Genotyp TG vor.

Bei der Entwicklung des Luciferase-Reportergen-Assays wurde die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors der 1321N1-Zellen in das Reporterplasmid kloniert (siehe Kapitel 15.1). Daher konnte anhand der Sequenzierung des erhaltenen Plasmids pGL4.14-25037 der Haplotyp eines Allels ermittelt werden: -491T, -427T, -219G und +113G (siehe Tabelle 6). Somit ergab sich für das zweite Allel der Haplotyp -491A, -427T, -219T und +113G.

15 Charakterisierung der *APOE*-Promotorregion

Im Zuge der Entwicklung eines Luciferase-Reportergen-Assays zur Identifizierung *APOE*-modulierender Substanzen und Pflanzenextrakte wurden Vektorkonstrukte kloniert, die die *APOE*-Promotorregion verschiedenen Ursprungs und Länge enthielten (siehe Kapitel 15.1 und 15.2). Hierfür wurde der kommerziell erhältliche Reportervektor pGL4.14 [*luc2*/Hygro] verwendet (Abbildung 21).

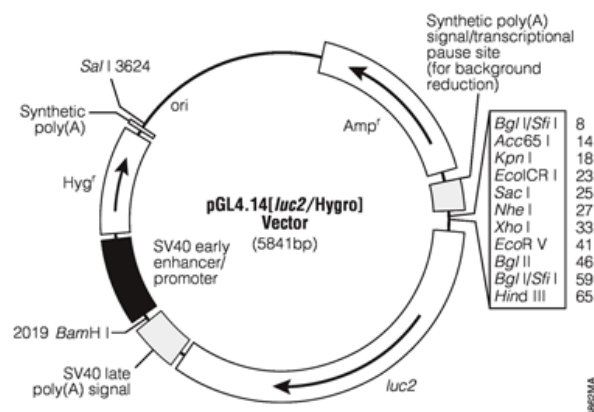


Abbildung 21:

Reportervektor pGL4.14 (Promega)

Der Vektor enthält das Reportergen *luc2* (*Luciferase* des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*) und eine Hygromycinresistenz *Hyg^r* (Internetquelle 9).

Dieser enthält das Reportergen *luc2* (*Luciferase* des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*), vor das die zu untersuchende Promotorregion kloniert werden kann. Eine Selektion von transfizierten gegenüber untransfizierten Zellen ist über ein im Vektor vorhandenes Hygromycin-resistenzgen möglich (Promega, 2005).

Um den Einfluss der Länge der *APOE*-Promotorregion auf die Expression des Reportergens ausschließen zu können, wurden zwei Promotorfragmente unterschiedlicher Länge in den Vektor pGL4.14 kloniert. Das erste Fragment bestand aus der Region -1000 bis +828, also bis zum Startcodon ATG. Die zur Amplifizierung dieser Region verwendete DNA wurde aus einer humanen Blutprobe gewonnen. Das zweite Fragment umfasste lediglich die 5'-regulatorische Region (-1011 bis +400). Hier wurde genomische DNA der 1321N1-Zellen zur Amplifizierung verwendet. Die Verwendung genomischer DNAs verschiedenen Ursprungs (1321N1-Zellen und Vollblut) diente dazu, eine Diversität von Haplotypen zu klonieren. Zusätzlich konnten durch Doppelstrangmutagenesen am Vektorkonstrukt der 5'-regulatorischen Region Plasmide erhalten werden, die sich hinsichtlich der von Artiga *et al.* (1998a) beschriebenen Punktmutationen an den Positionen -491 und -219 unterschieden.

15.1 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors der Astrozytomzelllinie 1321N1

Zur Klonierung der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors (-1011 bis +400) in den Reportervektor pGL4.14 [*luc2*/Hygro] fanden die Primer betagalforw1 und betagalrev1 Einsatz. Diese wurden in Anlehnung an García *et al.* (1996) so gewählt, dass durch die beiden Primer sowohl am 3'-Ende als auch am 5'-Ende der Sequenz der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors eine *Hind*-III-Schnittstelle eingeführt wurde. Hierfür wurde genomische DNA verwendet, die aus Zellen der Zelllinie 1321N1 nach der in Kapitel 9.1.4 beschriebenen Methode gewonnen wurde. Das fertige Vektorkonstrukt erhielt die interne Bezeichnung pGL4.14-25037. Die Fehlerfreiheit des Plasmids wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Bezüglich der Promotorpolymorphismen wurde der in Tabelle 6 angegebene Haplotyp -491T, -427T, -219G und +113G bestimmt.

15.2 *APOE*-Promotorregion einer humanen Blutprobe

Zur Amplifizierung der *APOE*-Promotorregion -1000 bis +828 wurde eine PCR an genomischer DNA mit den Primern Promotor.ApoE.for und Promotor.ApoE.rev

durchgeführt. Neben der Amplifizierung der gewünschten Promotorregion führten diese Primer am 5'-Ende eine *Xho*-I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Hind*-III-Schnittstelle ein. Die Gewinnung der genomischen DNA erfolgte aus 10 ml einer humanen Blutprobe nach der in Kapitel 9.1.4 beschriebenen Methode. Die in den Vektor pGL4.14 klonierte Promotorregion wurde vollständig mit Hilfe der Primer Promotor.ApoE.for, Promotor.ApoE.rev und Promotor.ApoE.mitte sequenziert. Das fertige Plasmid erhielt die interne Bezeichnung pGL4.14-25027. Der Haplotyp des klonierten Allels kann Tabelle 6 entnommen werden.

15.3 Promotormutanten

Durch Doppelstrangmutagenesen wurden in dem klonierten Reportervektor pGL4.14-25037, der die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors der 1321N1-Zellen enthält, Punktmutationen an den Positionen -491 und -219 eingeführt. Wie schon in Kapitel 2.5.1 beschrieben, nehmen insbesondere diese beiden SNPs Einfluss auf die Expression des *APOE*-Gens. Die erhaltenen Promotormutanten dienten der Untersuchung des Einflusses dieser in der Natur vorkommenden SNPs auf die Expression des *Luciferase*-Reportergens in stabil transfizierten Zellen.

Erfolgreiche Doppelstrangmutagenesen wurden an den Plasmiden pGL4.14-25037 und pGL4.14-25038 nach der in Kapitel 8.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Durch eine Sequenzierung der gewonnenen Plasmide wurde die Einführung der Punktmutationen bestätigt.

Folgende Plasmide wurden erhalten:

pGL4.14-25038	durch Einführung der Punktmutation -491 T zu A an Plasmid pGL4.14-25037
pGL4.14-25039	durch Einführung der Punktmutation -219 G zu T an Plasmid pGL4.14-25037
pGL4.14-25040	durch Einführung der Punktmutation -219 G zu T an Plasmid pGL4.14-25038

Insgesamt wurden fünf Vektoren erhalten, welche Einsatz bei transienten und stabilen Transfektionen fanden. Die folgende Tabelle 6 verdeutlicht den Aufbau der klonierten Promotorregionen bezüglich der von Artiga *et al.* (1998a) beschriebenen Punktmutationen.

Tabelle 6:
Übersicht der klonierten Vektoren

Plasmid-Nr.	Promotorregion	-491	-427	-219	+113
pGL4.14-25027	-1000 bis +828	A	T	G	G
pGL4.14-25037	-1011 bis +400	T	T	G	G
pGL4.14-25038	-1011 bis +400	A	T	G	G
pGL4.14-25039	-1011 bis +400	T	T	T	G
pGL4.14-25040	-1011 bis +400	A	T	T	G

16 Reporter-gen-Assay zur Identifizierung *APOE*-modulierender Verbindungen

Ziel der Etablierung eines Luciferase-Reporter-gen-Assays war die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung *APOE*-modulierender Substanzen und Extrakte. Hierfür wurde der Luciferase-Reportervektor pGL4.14 [*luc2*/Hygro] verwendet, bei welchem die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors vor das Reporter-gen *luc2* kloniert wurde (Kapitel 15.1). Wie schon in Kapitel 9.2 dargestellt, ist es mit Hilfe von stabil transfizierten Zelllinien möglich, anhand der unterschiedlichen Expression der *Luciferase* im Vergleich zum Kontrollexperiment den Einfluss von Substanzen bzw. Extrakten auf die klonierte *APOE*-Promotorregion zu erfassen und zu quantifizieren. Für die Entwicklung dieses Reporter-gen-Assays wurden Zellen der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1 stabil mit den in Tabelle 6 dargestellten Luciferase-Reportervektoren transfiziert. Im Laufe der Entwicklung des Assays wurden sowohl die Länge des klonierten Promotorfragments als auch die SNPs an den Positionen -491 und -219 der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors als mögliche Modulatoren der Expression des Reporter-gens in stabil transfizierten Zellen untersucht. Ebenso wurde die humane Glioblastomzelllinie U87-MG mit dem Reportervektor pGL4.14-25037 stabil transfiziert, um den Einflussfaktor „Zelllinie“ auf die Modulation der *Luciferase*-Expression ausschließen zu können.

16.1 Etablierung stabiler Reporter-gen-Zelllinien in der Astrozytomzelllinie 1321N1

16.1.1 Bestimmung der effektiven Konzentration zur Selektion mit Hygromycin-B

Im Vorfeld der stabilen Transfektion der 1321N1-Zellen wurde die effektive Konzentration von Hygromycin-B zur Selektion auf erfolgreich transfizierte Zellen bestimmt. Wie in Kapitel 9.1.2 beschrieben, wurde hierfür Hygromycin-B im Konzentrationsbereich von 50 bis 1000 µg/ml an der untransfizierten humanen Astrozytomzelllinie 1321N1 getestet. Als optimal wurde eine Konzentration von 250 µg/ml ermittelt. Hier waren nach einwöchiger Inkubation nahezu alle Zellen abgestorben.

16.1.2 Stabil transfizierte Zelllinien (1321N1)

Um einen Luciferase-Assay mit stabil transfizierten Zellen zu etablieren, wurde die humane Astrozytomzelllinie 1321N1 sowohl mit den Reportervektoren der vier Promotormutanten der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Gens, als auch mit dem Vektor der das längere Fragment des Promotors enthält, stabil transfiziert (Kapitel 9.1.1). Die Plasmide wurden im Vorfeld der Transfektion mit der Restriktionsendonuklease *Not* I linearisiert, um zum einen eine bessere Integration in das Genom der 1321N1-Zellen zu ermöglichen und zum anderen eine Spaltung des Plasmids in einem für den Assay benötigten Bereich (Hygromycinresistenz, Insert, *Luciferase*) zu verhindern. Durch die Linearisierung mit *Not* I wurden keine funktionellen Bereiche des Plasmids beeinträchtigt. Im Anschluss an die Transfektion des Plasmids fand eine Selektion mit Hygromycin-B statt. Die unter dem Mikroskop erkennbaren Klone wurden, wie in Kapitel 9.1.3 beschrieben, isoliert und kultiviert.

Durch die Transfektion der 1321N1-Zellen mit dem Reporterplasmid pGL4.14-25027, welches das längere Fragment der *APOE*-Promotorregion (-1000 bis +828) enthält, wurde die klonale Zelllinie 25027 Klon J erhalten. Sowohl Mischkulturen verschiedener Klone als auch klonale Zelllinien wurden durch Transfektion der Zellen mit den drei Promotormutanten pGL4.14-25037, pGL4.14-25038 und pGL4.14-25039 generiert. Durch die Transfektion des Plasmids pGL4.14-25040 konnten lediglich Mischkulturen verschiedener Klone erhalten werden, die im Gegensatz zu allen anderen stabilen Zelllinien keine Luciferase-Aktivität aufwiesen. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Zelllinien.

Tabelle 7:
Stabil transfizierte Zelllinien ausgehend von 1321N1-Zellen

Plasmid-Nr.	Etablierte Zelllinie
pGL4.14-25027	klonale Zelllinie (25027 Klon J)
pGL4.14-25037	Mischkultur verschiedener Klone (MK 25037) klonale Zelllinie (25037 Klon 8)
pGL4.14-25038	Mischkultur verschiedener Klone (MK 25038) klonale Zelllinie (25038 Klon L3)
pGL4.14-25039	Mischkultur verschiedener Klone (MK 25039) klonale Zelllinie (25039 Klon 6)
pGL4.14-25040	Mischkultur verschiedener Klone (MK 25040), keine Luciferase-Aktivität Mischkultur verschiedener Klone (MKz 25040), keine Luciferase-Aktivität

16.1.3 Zelllinien MK 25040 und MKz 25040

Da bei der Generierung einer stabilen Zelllinie aus 1321N1-Zellen durch die Transfektion des Plasmids pGL4.14-25040 weder eine Mischkultur noch eine klonale Zelllinie erhalten werden konnte, welche eine mit dem *Dual-GloTM Luciferase Assay System* (Promega) messbare Luciferase-Aktivität zeigte, wurden die beiden erhaltenen Mischkulturen MK 25040 und MKz 25040 zur Fehlererkennung einer genaueren Prüfung unterzogen. Durch die Bildung von Klonen in den *6well*-Mikrotiterplatten konnte man erkennen, dass im Vergleich zum zellfreien Kontroll-*well* zwar eine Resistenz der Zellen gegenüber Hygromycin-B vermittelt wurde, jedoch nicht die Fähigkeit zur Bildung der Luciferase. Auch die Transfektion des Plasmids pGL4.14-25040 in zirkulärer Form (resultierend in der Mischkultur MKz 25040) brachte keine Veränderung im Vergleich zur Transfektion des linearisierten Plasmids. Als Ursachen für fehlende Luciferase-Aktivität kamen folgende Möglichkeiten in Betracht: fehlende Integration der *Luciferase*-Sequenz in das Genom der Zellen, mangelnhafte RNA-Expression oder die Bildung eines nicht-funktionalen Proteins.

PCR zur Detektion der Luciferase-Sequenz in genomischer DNA der Mischkulturen

Zur Überprüfung der Integration des Plasmids pGL4.14-25040 in das Erbgut der 1321N1-Zellen wurde mit Hilfe der Primer Luci-RT-for und Luci-RT-rev eine PCR an genomischer DNA (gewonnen nach der in Kapitel 9.1.4 dargestellten Methode) durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten das Plasmid pGL4.14-25040 und der *Luciferase*-positive Klon J. Die Negativkontrollen bestanden aus einem *Luciferase*-freien Plasmid, genomischer DNA der nativen Zelllinie 1321N1 sowie der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa. Weiterhin wurde eine DNA-freie Kontrolle (NTC) mitgeführt.

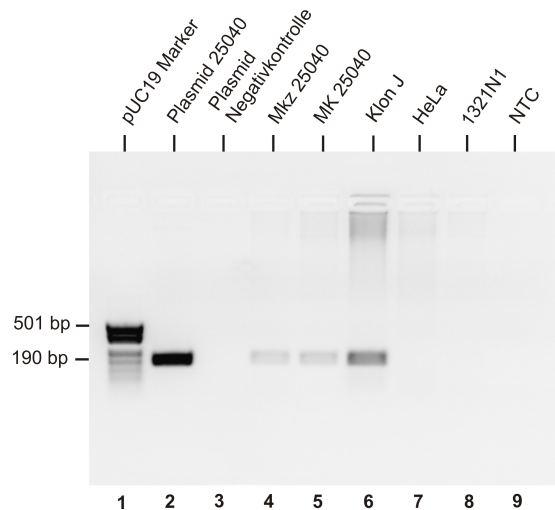


Abbildung 22: PCR zur Detektion der Luciferase-Sequenz in genomischer DNA der Mischkulturen der 1321N1-Zellen

Agarose-Gel-Elektrophorese der PCR auf Vorhandensein der *Luciferase*-Sequenz in genomischer DNA der Mischkulturen MK 25040 und Mkz 25040.

Positivkontrolle: Plasmid pGL4.14-25040 und *Luciferase*-positiver Klon J.

Negativkontrolle: *Luciferase*-freies Plasmid, native Zelllinie 1321N1 und HeLa-Zelllinie.

Nach Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese (Abbildung 22) wiesen die Positivkontrollen eine Bande der richtigen Größe (188 bp) auf, welche sich auch bei den beiden Mischkulturen MK 25040 und MKz 25040 wieder fand. Die Negativkontrollen und die DNA-freie Kontrolle (NTC) wiesen keine Bande auf. Dies lässt auf eine Integration des Plasmids in das Genom der 1321N1-Zellen schließen.

Real-Time-RT-PCR zur Detektion der Luciferase-Expression

Um die Bildung der *Luciferase*-RNA in den Mischkulturen zu überprüfen, wurde die *Real-Time*-RT-PCR als hochsensitive Messmethode gewählt. Als endogenes Referenzgen wurde *GAPDH* herangezogen. Total-RNA wurde aus Zellen der Zellkultur (MK 25040 und MKz 25040), wie in Kapitel 9.1.5 dargestellt, isoliert. Die *Real-Time*-RT-PCR-Messungen wurden nach der in Kapitel 10.3 beschriebenen Methode unter Verwendung der Primer für *GAPDH* (*GAPDH_for*, *GAPDH_rev*) und *Luciferase* (*Luci-RT-for*, *Luci-RT-rev*) in einer Konzentration von je 300 nM durchgeführt. Die *Annealing*-Temperatur wurde auf 60 °C heraufgesetzt, um eine selektivere Bindung der *Luciferase*-Primer zu gewährleisten. Für *GAPDH* und *Luciferase* wurde pro Zelllinie je ein Triplet vermessen. Weiterhin wurde je eine Kontrolle ohne RNA (NTC) und eine Kontrolle ohne reverse Transkription (No-RT) zum Test auf Verunreinigung der RNA durch genomische DNA mitgeführt.

Da hier kein Vergleich von stimulierten Zellen im Gegensatz zu unbehandelten Zellen stattfand, war es nicht möglich einen *fold change* zu berechnen. Es wurde lediglich die Differenz zwischen dem c_t -Wert der NTC und den c_t -Werten der RNA der Zelllinien betrachtet, um Rückschlüsse ziehen zu können, ob RNA zu dem entsprechenden Gen in den Zellen gebildet wird. Dies ist möglich, da die NTC keine RNA enthält und somit einer Probe

ohne *Luciferase*-Expression entspricht. Ist also der c_t -Wert der Zelllinie niedriger als der der NTC, wurde das entsprechende Gen transkribiert.

Tabelle 8:

Ergebnis der *Real-Time*-RT-PCR auf *Luciferase*-RNA in den Zelllinien MK 25040 und MKz 25040

c_t -Wert	Luciferase MK 25040	Luciferase MKz 25040	GAPDH MK 25040	GAPDH MKz 25040
1	19,20	18,77	13,97	13,92
2	18,93	18,80	14,00	13,86
3	18,76	18,70	13,95	14,00
NTC	19,56	19,56	23,77	23,77
No-RT	no c_t	26,12	33,02	35,64

Bei beiden Zelllinien waren die c_t -Werte der *Luciferase* nahezu identisch mit denen der NTC. Dies lässt auf eine fehlende *Luciferase*-Expression schließen (Tabelle 8). *GAPDH*, welches als Kontrolle diente, zeigte hingegen eine Differenz von zehn Zyklen zwischen der NTC und den gemessenen RNA-Proben, was auf eine Expression schließen lässt. Somit konnte gezeigt werden, dass das Plasmid zwar in die genomische DNA integriert wurde, es jedoch bei den beiden Mischkulturen MK 25040 und MKz 25040 nicht zu einer Expression des *Luciferase*-Gens kam.

16.2 Validierung mit Dibutyryl-cAMP: Einfluss der klonierten Promotorregion

Alle aus den 1321N1-Zellen etablierten, stabil transfizierten Zelllinien wurden zur Entwicklung und Validierung des *Luciferase*-Reporter-Gen-Assays mit Dibutyryl-cAMP in einer Konzentration von 1 mM über 24 h inkubiert. Da sowohl Cedazo-Mínguez *et al.* (2001a) eine Induktion der *APOE*-mRNA-Expression in primären Rattenzellen (Astrozyten), als auch García *et al.* (1996) einen induktiven Effekt auf den *APOE*-Promotor in einem Reporter-Gen-Assay mit transient transfizierten humanen U87-MG-Glioblastomzellen durch Dibutyryl-cAMP beschrieben haben, wurde diese Verbindung zur Validierung des Assays verwendet. Pro Zelllinie wurden je drei unabhängige Messungen in einem Triplet durchgeführt ($n = 3$). Nach der 24-stündigen Inkubation wurde die *Luciferase* mit Hilfe des *Bright-GloTM Luciferase Assay System* (Promega) gemessen und der Einfluss auf die Regulation des Reportergens berechnet. Die erhaltenen Werte wurden als *fold change* ausgedrückt. Ein FC von 1 steht für fehlende Regulation, während höhere bzw. niedrigere Werte einer Induktion bzw. Repression entsprechen.

Es wurden die Zelllinien 25027 Klon J, MK 25037, 25037 Klon 8, MK 25038, 25038 Klon L3, MK 25039 und 25039 Klon 6 analog zu dem in Kapitel 9.2.2 beschriebenen Luciferase-Reporter-Gen-Assay mit Dibutyl-cAMP behandelt und die Biolumineszenz gemessen. Als Kontrollsubstanz diente das Assay-Medium (Luciferase, stabile Zellen), da Dibutyl-cAMP in diesem Medium gelöst vorlag. Die Berechnung der *fold changes* nach der in Kapitel 9.2.2 beschriebenen Methode. Obwohl in der Literatur von einer Induktion des *APOE*-Gens durch Dibutyl-cAMP berichtet wird (García *et al.*, 1996), konnte in allen Zelllinien eine statistisch signifikante Repression des Reportergens *Luciferase* beobachtet werden. Eine Inkubation der Zelllinie 25039 Klon 6 führte mit einem *fold change* von $0,36 \pm 0,02$ zur stärksten negativen Regulation. Die schwächste Regulation mit einem FC von $0,76 \pm 0,12$ wurde bei der Zelllinie 25027 Klon J beobachtet.

Da eine Normalisierung des Luciferase-Wertes auf den MTT-Wert, also auf Anzahl bzw. Vitalität der Zellen erfolgte, üben Verringerungen der Luciferase-Aktivität die auf zytotoxische Effekte zurückzuführen sind, keinen Einfluss auf den Wert der FC aus und können somit als Ursache für mögliche falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden (siehe Berechnung Kapitel 9.2.2).

Eine komplette Übersicht der Messwerte für Zelllinien ist als Tabelle A2 des Anhangs gegeben. Einen graphischen Überblick gibt Abbildung 23.

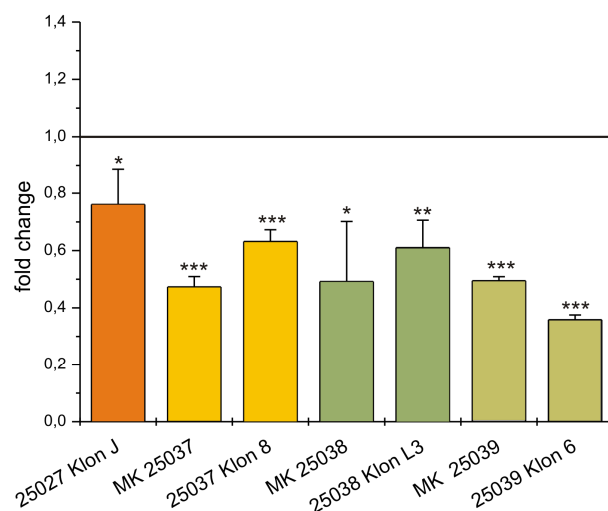


Abbildung 23: Validierung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays (stabile 1321N1-Zelllinien) mit Dibutyl-cAMP

Luciferase-Aktivität in stabil transfizierten 1321N1-Zelllinien nach 24-stündiger Inkubation mit 1mM Dibutyl-cAMP.

n = 3; \pm SD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Die Ergebnisse zeigen, dass weder die Länge des klonierten Promotorabschnitts noch die unterschiedlichen SNPs in der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors einen Einfluss auf die inverse Regulation des Reportergens ausüben. Keine der erhaltenen stabilen Zelllinien zeigte die in der Literatur bei transient transfizierten Zellen beschriebene Induktion des Reportergens durch Dibutyryl-cAMP, sondern eine Repression des Transkripts.

16.3 Regulation der *APOE*-Expression

Um die inverse Regulation des *Luciferase*-Gens im Reportergen-Assay mit stabil transfizierten 1321N1-Zellen genauer untersuchen zu können, wurden neben der Luciferase-Messung auch *Real-Time*-RT-PCR-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde die Transkriptionsrate der *Luciferase* im Verhältnis zum Referenzgen *GAPDH* bestimmt, um eine Korrelation zwischen Luciferase-Aktivität und *Luciferase*-Genexpression untersuchen zu können. Parallel dazu fand auch eine Quantifizierung der endogenen *APOE*-mRNA statt. Dies diente zur Kontrolle, ob die Regulierung des Promotors, der gekoppelt an *Luciferase* stabil ins Genom eingebracht wurde, mit einer Regulierung des endogenen *APOE*-Promotors konform geht. Neben der als Induktor beschriebenen Substanz Dibutyryl-cAMP wurden die Zellen auch mit dem im späteren Extrakt-Screening (siehe Kapitel 18.3) als Suppressor der *APOE*-Expression identifizierten Extrakt 2576-10 C der Pflanze *Tabernaemontana pandacaqui* und der aktiven Fraktion B 1 der Extraktfraktionierung behandelt. Extrakt sowie Fraktion wurden für diesen Versuch verwendet, um ein umfassendes Bild zu erhalten. So konnte die inverse Regulation im Reportergen-Assay sowohl an einem Induktor (Dibutyryl-cAMP) als auch zwei Suppressoren (Extrakt und Fraktion) näher untersucht werden.

Dazu wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen der Zelllinie 25037 Klon 8 pro *well* einer 6*well*-Mikrotiterplatte eingesät und am darauf folgenden Tag mit Dibutyryl-cAMP (1 mM), Extrakt 2576-10 C (50 µg/ml) und Fraktion B 1 (50 µg/ml) der Extraktfraktionierung (siehe Kapitel 20.3.1) inkubiert. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit DMSO (0,1 %). Nach 24 h wurden die Zellen durch Trypsin-Einwirkung (300 µl) aus den *wells* gelöst, mit 800 µl Assay-Medium (MTT) verdünnt und die so erhaltene Suspension zu zwei gleichen Teilen einerseits für die Gewinnung der Total-RNA und andererseits für die Durchführung von Luciferase- und des MTT-Test verwendet. Für den MTT-Test wurden pro Inkubation 6 *wells* einer 96*well*-Mikrotiterplatte mit 50 µl der Zellsuspension befüllt, 50 µl MTT-Lösung (1 mg/ml) zugegeben und der Assay, wie in Kapitel 9.2.3 beschrieben, durchgeführt. Zur Luciferase-Messung wurden 3×50 µl derselben Zellsuspension des MTT-Tests in eine

LUMITRAC[®] 200-Platte pipettiert und unter Verwendung des *Bright-Glo[™] Luciferase Assay System* (Promega) gemessen. Die Berechnung der *fold changes* fand, wie in Kapitel 9.2.2 beschrieben, statt.

Die *Real-Time-RT-PCR* wurde analog zu der in Kapitel 10.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Es fand lediglich eine Anhebung der *Annealing*-Temperatur auf 60 °C statt. Zur Quantifizierung der *Luciferase* wurden die Primer Luci-RT-for und Luci-RT-rev verwendet. Alle Primer wurden in einer Konzentration von 300 nM eingesetzt. Da hier nicht, wie bei der in Kapitel 10 beschriebenen Methode, eine ganze Testreihe stattfand, sondern lediglich eine Messung, wurde auf eine experimentelle Bestimmung der Effizienz verzichtet und der theoretische Wert von 2 der Berechnung der *fold changes* zu Grunde gelegt.

Im Luciferase-Reportergen-Assay resultierte eine Inkubation mit Dibutyryl-cAMP in einer $FC = 0,63$, die Quantifizierung der *Luciferase*-mRNA ergab einen Wert von $FC = 0,88$ und die der endogenen *APOE*-mRNA $FC = 1,61$. Die Behandlung mit Extrakt 2576-10 C bewirkte im Reportergen-Assay einen deutlichen Anstieg der Luciferase-Aktivität ($FC = 3,04$). Während die *Luciferase*-mRNA ebenfalls induziert exprimiert wurde ($FC = 2,58$), war eine Repression der endogenen *APOE*-mRNA-Expression zu verzeichnen ($FC = 0,75$). Die Fraktion B 1 führte analog zu 2576-10 C zu einer Induktion im Luciferase-Assay ($FC = 6,10$) sowie der *Luciferase*-mRNA ($FC = 3,16$) und zu einer negativen Regulation des *APOE*-Transkriptes ($FC = 0,68$).

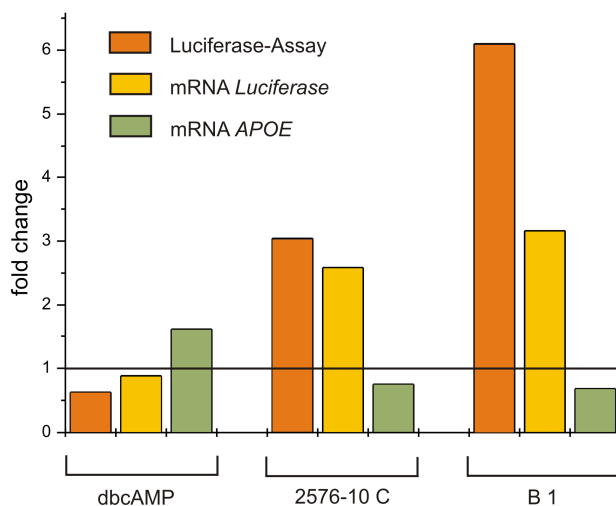


Abbildung 24:
Gegenüberstellung der Messung der Luciferase-Aktivität sowie der *Real-Time-RT-PCR*-Messungen der mRNA der *Luciferase* und des endogenen *APOE* (1)
Berechnung der *fold changes* einer Messung nach 24-stündiger Inkubation der Zellen 25037 Klon 8 mit Dibutyryl-cAMP (1mM), Extrakt 2576-10 C (50 µg/ml) und Fraktion B1 (50 µg/ml).

Abbildung 24 fasst nochmals graphisch zusammen, dass eine Induktion der Luciferase-Aktivität im Luciferase-Reportergen-Assay durch den Extrakt 2576-10 C bzw. die Fraktion B 1 mit einer Erhöhung der *Luciferase*-mRNA einherging. Ebenso verhielt es sich bei der Repression durch Dibutyryl-cAMP. Messfehler konnten somit bei dem Reportergen-Assay als

Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da eine Erhöhung der Luciferase-Aktivität mit einer mRNA-Erhöhung des Enzyms korrelierte. Betrachtet man jedoch die Regulation des endogenen *APOE*-Gens, so fällt auf, dass dieses in den drei Experimenten stets gegenläufig reguliert wurde.

Zur Verifizierung der gegenläufigen Regulation von Reportergen und endogenem *APOE* wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit die Zelllinie 25027 Klon J, die das längere Fragment des *APOE*-Promotors enthält, mit dem aktiven Dichlormethanextrakt A 1 der Pflanze *T. pandacqui* inkubiert und nach eben beschriebener Methode vermessen. Nach drei voneinander unabhängigen Messungen wurde folgendes Ergebnis erhalten:

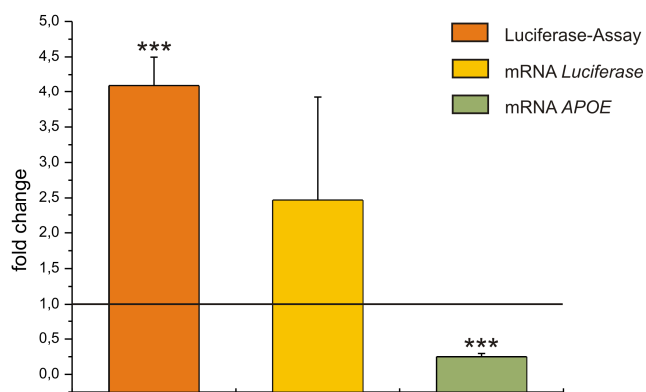


Abbildung 25:
Gegenüberstellung der Messung der Luciferase-Aktivität sowie der *Real-Time-RT-PCR*-Messungen der mRNA der *Luciferase* und des endogenen *APOE* (2)

Berechnung der *fold changes* dreier Messung nach 24-stündiger Inkubation der Zellen 25027 Klon J mit Extrakt A 1 (50 µg/ml).

n = 3; ± SD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Auch hier zeigte sich die schon im ersten Versuch angedeutete gegenläufige Regulation von Reportergen und endogenem *APOE*. Eine Inkubation der Zellen mit dem Extrakt A 1 resultierte in einer Induktion der Luciferase-Aktivität (FC = $4,10 \pm 0,40$; p < 0,001; Student's t-Test) und der *Luciferase*-mRNA (FC = $2,47 \pm 1,45$; p > 0,05; Student's t-Test). Eine Regulation der *APOE*-mRNA fand in entgegengesetzter Richtung statt (FC = $0,25 \pm 0,05$; p < 0,001; Student's t-Test). Die Tatsache, dass die Induktion der Luciferase-Aktivität mit einem Anstieg der mRNA einhergeht, spricht für die Validität des Reportergen-Assays.

16.4 Einfluss der Zelllinie: stabile Transfektion der Glioblastomzelllinie U87-MG

Die Etablierung einer stabilen Zelllinie, ausgehend von der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG, diente dem Zweck der Untersuchung, ob die beschriebene gegenläufige Regulation

von Luciferase-Aktivität und *APOE*-Expression ein zelllinienspezifisches Problem darstellt. Daher wurde neben den 1321N1-Zellen eine zweite Zelllinie stabil transfiziert. Die zuvor durchgeführten Transfektionen der Astrozytomzelllinie 1321N1 zeigten, dass weder eine Variation in der Länge des Promotorabschnitts noch die Einführung verschiedener Punktmutationen in der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors zu einer Veränderung der *Luciferase*-Expression im Reportergen-Assay führten. Die Stimulation der stabilen Zelllinien mit Dibutyryl-cAMP führte in allen Fällen zu einer reprimierten Expression des Reportergens, obwohl diese Substanz als Induktor bekannt ist. Sowohl eine Stimulation primärer Ratten-Astrozyten (Cedazo-Mínguez *et al.*, 2001a) als auch transient transfizierter humaner U87-MG-Glioblastomzellen (García *et al.*, 1996) resultierte in einer Induktion der *APOE*-mRNA-Expression bzw. der Expression des Reporterplasmids. Da dieser Effekt im eigenen Versuch durch die stabile Transfektion der 1321N1-Zellen nicht reproduziert werden konnte, wurden die von García *et al.* verwendeten U87-MG-Zellen mit dem Plasmid pGL4.14-25037 stabil transfiziert.

16.4.1 Bestimmung der effektiven Konzentration zur Selektion mit Hygromycin-B

Um die effektive Konzentration zur Selektion der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG zu bestimmen, wurde, nach der in Kapitel 9.1.2 beschriebenen Methode, Hygromycin-B im Konzentrationsbereich von 50 bis 1000 µg/ml an untransfizierten Zellen getestet. Es wurde die Konzentration 100 µg/ml ausgewählt, da nach einwöchiger Inkubation nahezu alle Zellen abgestorben waren.

16.4.2 Stabil transfizierte Zelllinien (U87-MG)

Die Glioblastomzelllinie U87-MG wurde lediglich mit dem Plasmid pGL4.14-25037 mittels der in Kapitel 9.1.1 beschriebenen Methode stabil transfiziert. Auch hier wurde das Plasmid vor der Transfektion mit der Restriktionsendonuklease *Not* I linearisiert. Es entstand eine Mischkultur verschiedener Klone (U87 MK 25037) sowie die klonale Zelllinie U87 25037 Klon 4.

16.4.3 Validierung mit Dibutyryl-cAMP (U87-MG-Zellen)

Die stabile Mischkultur-Zelllinie U87 MK 25037 und die dazugehörigen klonale Zelllinie U87 25037 Klon 4 wurden mit Dibutyryl-cAMP behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Veränderung der *Luciferase*-Aktivität der inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (DMSO 0,1 %) unter Verwendung des *Bright-Glo™ Luciferase Assay System* (Promega) gemessen. Lediglich die negative Regulation in der Zelllinie des Klon 4 ($FC = 0,62 \pm 0,08$; $p < 0,01$; Student's t-Test) konnte als statistisch signifikant eingestuft werden, wohingegen in der Mischkultur ($FC = 0,88 \pm 0,04$; $p > 0,05$; Student's t-Test) die *Luciferase* nicht signifikant reguliert war.

Obwohl García *et al.* (1996) für transient transfizierte U87-MG-Zellen eine induzierte Expression des Reportergens *Luciferase* nach einer Inkubation mit Dibutyryl-cAMP beschreiben, konnte dieser Effekt in stabil transfizierten Zelllinien U87 MK 25037 und U87 25037 Klon 4 nicht reproduziert werden (Abbildung 26).

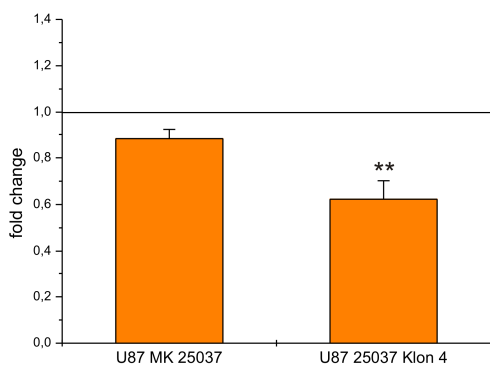


Abbildung 26:

Validierung des Luciferase-Reportergen-Assays (stabile U87-MG-Zelllinien) mit Dibutyryl-cAMP

Regulation der *Luciferase*-Aktivität in den Zelllinien U87 MK 25037 und U87 25037 Klon 4 nach einer 24-stündigen Inkubation mit 1 mM Dibutyryl-cAMP.

$n = 3$; \pm SD

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

(Student's t-Test)

Die Untersuchung der Stimulation mehrerer klonaler Zelllinien wäre zwar aussagekräftiger gewesen, jedoch hätte sich sehr wahrscheinlich keine Änderung hinsichtlich der inversen Regulation des Reportergens ergeben, denn auch die Mischkultur verschiedener Klone zeigt, wenn auch nur in geringem Umfang, eine reprimierte Expression der *Luciferase*.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle generierten Zelllinien im *Luciferase*-Reportergen-Assay eine inverse Regulation nach einer Stimulation mit Dibutyryl-cAMP zeigten. Diese war unabhängig von der Länge des Promotorfragments, der vorkommenden SNPs in der *APOE*-Promotorregion und der transfizierten Zelllinie. Alle Zelllinien zeigten mit einer Repression zwar eine Reaktion auf die Stimulierung, jedoch konnten die Ergebnisse nicht mit der in der Literatur zu findenden Daten in Einklang gebracht werden. Untersuchungen der endogenen *APOE*-mRNA zeigten, dass die Regulation des Reportergens

stets gegenläufig zur endogenen Regulation des *APOE*-Gens war. Somit ist es zwar mit dem entwickelten Reporter-gen-Assay möglich, Substanzen zu detektieren, die zu einer Änderung der *APOE*-Promotor-Aktivität führen, jedoch scheint die Regulation des Reporter-gens nicht die Regulation des authentischen *APOE*-Gens widerzuspiegeln. Dennoch bietet der Assay, trotz seiner inversen Regulation, eine einfache und schnelle Möglichkeit der Suche nach *APOE*-mRNA-modulierenden Substanzen und wurde zunächst auch so eingesetzt (siehe Kapitel 18).

17 *Real-Time*-RT-PCR zur Verifizierung der *APOE*-Regulation

Die Entwicklung des Luciferase-Reporter-gen-Assays mit stabil transfizierten Zellen führte zwar zu einem Assay, mit dem es möglich war, *APOE*-mRNA-modulierende Substanzen zu detektieren, jedoch war bei allen generierten Zelllinien eine gegenläufige Regulation zwischen *APOE*-Gen und Reporter-gen zu beobachten (siehe Kapitel 16.3). Da keine der generierten stabilen Zelllinien die Regulation des Reporter-gens mit der des endogenen *APOEs* in Einklang bringen konnte, wurde eine weitere Methode zur Testung von *APOE*-mRNA-modulierenden Substanzen eingesetzt. Diese basierte auf der Grundlage der *Real-Time*-RT-PCR, und machte es so möglich, den Einfluss von Substanzen und Extrakten auf die Expression des *APOE*-Gens direkt in der Zelle zu untersuchen. Als Referenzgen (*housekeeping gene*) wurde *GAPDH* verwendet. Wie schon in Kapitel 10.1 beschrieben, wird dieses Gen in Zellen in gleichem Maße konstitutiv exprimiert und nicht reguliert. Da hier eine relative Quantifizierung stattfand, wurde die Menge des zu bestimmenden Gens ins Verhältnis zu dem endogenen Referenzgen gesetzt und der *fold change*, also die Veränderung der RNA-Menge im Vergleich Stimulation zu Kontrolle, berechnet.

Da sich ein Screening mit *Real-Time*-RT-PCR im Vergleich zum Luciferase-Reporter-gen-Assays mit stabil transfizierten Zellen weitaus zeitaufwändiger und kostenintensiver darstellt, wurden hiermit lediglich ausgewählte Extrakte und Substanzen gemessen, die im Reporter-gen-Assay eine modulierende Aktivität zeigten.

17.1 Bestimmung der Effizienzen der Amplifizierung von *APOE* und *GAPDH*

Um eine Quantifizierung der mRNA nach der von Pfaffl (2001) vorgestellten Berechnungsmethode durchführen zu können, wurden im Vorfeld der Assayentwicklung die Effizienzen der Amplifizierung der cDNA der Gene *APOE* und *GAPDH* experimentell bestimmt. Obwohl der theoretische Wert der Effizienz bei 2 (entspricht 100 %) liegt, schwanken die tatsächlichen Effizienzen zwischen 1.6 und 2.1 liegen (Pfaffl, 2003), und oft kann für Referenz- und Zielgen nicht die gleiche Effizienz ermittelt werden (Liu und Saint, 2002). Somit ist es erforderlich, zur korrekten Berechnung von Genexpressionsdaten, die Amplifizierungseffizienzen experimentell zu bestimmen.

Zur Effizienz-Bestimmung wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, bei welchen fünf verschiedene Total-RNA-Mengen (5, 10, 25, 50 und 100 ng) je dreimal nach der in Kapitel 10.3 beschriebenen Methode gemessen wurden ($n = 3$). Eine Validierung der optimalen Primerkombinationen für die Amplifizierung der zu bestimmenden Gene ergab für *GAPDH* eine Kombination des *Forward*-Primers GAPDH_for in einer Konzentration von 75 nM mit dem *Reverse*-Primer GAPDH_rev in einer Konzentration von 300 nM und für *APOE* die Kombination der beiden Primer ApoE-RT-5-4 und ApoE-RT-3-3 in einer Konzentration von je 300 nM. Die Bestimmung der Effizienz E war durch Einbeziehung der erhaltenen Steigung (*slope*) der Geraden möglich, welche sich ergibt, wenn man die c_t -Werte (y-Achse) in einem Diagramm gegen die entsprechenden eingesetzten RNA-Mengen (x-Achse) aufträgt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

So konnte für *GAPDH* eine Effizienz von 2,113 (111,3 %) und für *APOE* eine Effizienz von 2,0207 (102,07 %) ermittelt werden (Tabelle 9).

Tabelle 9:

Berechnung der Effizienzen von *APOE* und *GAPDH* zur Quantifizierung mittels *Real-Time*-RT-PCR nach Pfaffl (2001)

	slope	Effizienz [%]	Effizienz
<i>APOE</i>	-3,463	94,4	1,944
	-3,265	102,5	2,025
	-3,117	109,3	2,093
	Mittelwert	102,07	2,0207
<i>GAPDH</i>	-3,278	101,9	2,019
	-2,831	125,5	2,255
	-3,175	106,5	2,065
	Mittelwert	111,3	2,113

17.2 Validierung der *Real-Time*-RT-PCR-Methode mit Dibutyryl-cAMP

Zur Validierung der *Real-Time*-RT-PCR wurde, wie schon beim Luciferase-Reportergen-Assays mit stabil transfizierten Zellen, die in der Literatur als *APOE*-induzierend beschriebene Substanz Dibutyryl-cAMP getestet. Nach einer Zellstimulation (siehe Kapitel 10.2) über 24 h in einer Konzentration von 1 mM wurde die Total-RNA mit Hilfe des *RNeasy*[®] *Mini Kit* (Quiagen) gewonnen und wie in Kapitel 10.3 beschrieben mittels *Real-Time*-RT-PCR in drei voneinander unabhängigen Experimenten quantifiziert. Es wurden sowohl die humanen Astrozytomzellen 1321N1 als auch die humanen Glioblastomzellen U87-MG mit Dibutyryl-cAMP behandelt.

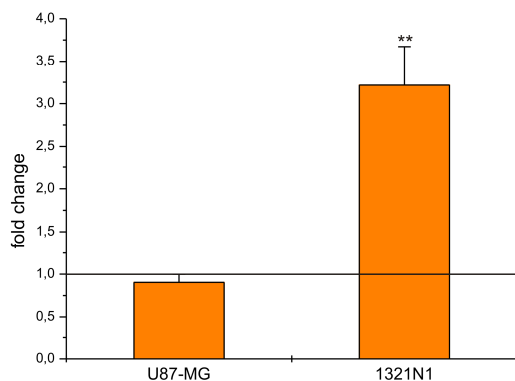


Abbildung 27:
Validierung der *Real-Time*-RT-PCR-Methode mit Dibutyryl-cAMP

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse (*Real-Time*-RT-PCR) nach 24-stündiger Inkubation der Zelllinien U87-MG und 1321N1 mit Dibutyryl-cAMP (1 mM). Darstellung der berechneten *fold changes* (*APOE*-mRNA) von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

n = 3; \pm SD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001
(Student's t-Test)

In der Zelllinie 1321N1 war eine Induktion der *APOE*-mRNA mit einem FC = $3,22 \pm 0,46$; p < 0,01; Student's t-Test zu beobachten. Die erhaltenen Werte konnten mit Literaturangaben in Einklang gebracht werden (Cedazo-Mínguez *et al.*, 2001a). Anders verhielt es sich bei der Glioblastomzelllinie U87-MG. Hier konnte keine statistisch signifikante Regulation beobachtet werden (FC = $0,91 \pm 0,10$). Dies widerspricht den Ergebnissen von García *et al.* (1996), die in einem Reportergen-Assay nach einer transienten Transfektion eines Plasmids, welches die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Gens gekoppelt an *Luciferase* enthielt, eine Induktion der Expression des Reportergens beobachteten. Betrachtet man die für den Luciferase-Reportergen-Assay generierten stabilen Zelllinien (Kapitel 16.4.3), so ist zu erkennen, dass auch hier die Mischkultur U87 MK 25037 keine Induktion des Reportergens nach einem Stimulus mit Dibutyryl-cAMP zeigte. Es konnte zwar bei der klonalen Zelllinie U87 25037 Klon 4 eine reprimierte Expression des Reportergens beobachtet werden, jedoch ist, wie bereits in Kapitel 16.4.3 erwähnt, die Analyse nur eines Klons nicht ausreichend. Um aussagekräftige Ergebnisse über den Einfluss von Dibutyryl-cAMP auf den klonierten Promotor-Abschnitt im Reportersystem in U87-MG-Zellen zu erhalten, hätten mehrere Klone untersucht werden müssen.

Die oben dargestellten Ergebnisse belegen, dass mit Hilfe der Methode der *Real-Time-RT-PCR* der Einfluss von Substanzen und Extrakten auf die Regulation des *APOE*-Gens untersucht werden kann. Anhand der Daten einer Stimulation der 1321N1-Zellen mit Dibutyryl-cAMP kann die hier verwendete Methode als valide angesehen werden. Es war möglich, die in der Literatur beschriebene Induktion der *APOE*-Expression in 1321N1-Zellen zu reproduzieren.

18 Screening nach *APOE*-modulierenden Substanzen und Extrakten

Mit Hilfe des entwickelten Luciferase-Reportergen-Assays (siehe Kapitel 16) fand ein Screening auf *APOE*-modulierende Substanzen und Extrakte statt. Neben Reinsubstanzen wurden auch Extrakte ausgewählter Pflanzen der Traditionellen Chinesischen Medizin und Extrakte von Pflanzen einer Wildsammlung aus dem Inselstaat Vanuatu getestet.

Obwohl der Assay in der Validierung mit der schon in der Literatur als Induktor beschriebenen Substanz Dibutyryl-cAMP inverse Ergebnisse lieferte (siehe Kapitel 16.3), wurde er zum weiteren Screening eingesetzt. Parallele Untersuchungen der Regulation des Reportergens und der mRNA des endogenen *APOEs* zeigten eine verlässliche Korrelation zwischen Induktion der Luciferase und Repression der RNA-Expression des endogenen *APOE*. So war es über den Luciferase-Reportergen-Assay möglich, eine Aussage hinsichtlich der Einflussnahme einer Substanz auf die Regulation des *APOE*-Gens zu treffen.

Das Screenings wurde analog zur im Kapitel 9.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Substanzen bzw. Extrakte mit einem *fold change* $< 0,6$ oder $> 1,5$ wurden weiteren Testungen unterzogen und die *fold changes* in drei voneinander unabhängigen Messungen (je ein Triplett) bestimmt ($n = 3$).

Da dieser Assay nicht das Geschehen in der Zelle, also die Regulation des endogenen *APOE*-Gens widerspiegelt, wurden ausgewählte Substanzen und Extrakte, die eine *APOE*-modulierende Aktivität zeigten, zur Verifizierung mit einer unabhängigen Messmethode (*Real-Time-RT-PCR*, siehe Kapitel 18.1.2, 18.2.2 und 20.4) gemessen. So wurde der direkte Einfluss auf die Regulation des *APOE*-Gens in untransfizierten Zellen untersucht.

18.1 Reinsubstanzen

Es wurden insgesamt 39 Substanzen getestet, die alle der Substanzbibliothek des medizinisch-chemischen Labors von Prof. Dr. Jochen Lehmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) entstammten. Neben der bei der Therapie der Alzheimer-Demenz eingesetzten Cholinesterasehemmer Rivastigmin, Galantamin und Tacrin wurden auch weitere potentielle AChE-Hemmer (β -Carboline), Statine, Flurbiprofen und dessen Derivate sowie das in Bärlappgewächsen vorkommende Huperzin A auf Aktivität am *APOE*-Promotor untersucht.

18.1.1 Screening der Reinsubstanzen im Luciferase-Reportergen-Assay

Die Reinsubstanzen wurden an der Zelllinie 25037 Klon 8 getestet. In der ersten Testreihe fand eine Inkubation der Zellen mit den Substanzen in den Konzentrationen 10 μ M und 100 μ M für 24 h statt. Die Daten der FCs aller Reinsubstanzen finden sich im Anhang in Tabelle A3.

Einige Substanzen wurden nach der ersten Testreihe von weiteren Tests ausgeschlossen. Grund dafür waren zytotoxische Effekte, welche zum einen bei mikroskopischer Begutachtung der Zellen nach 24-stündiger Inkubation auffällig waren, und zum anderen durch die Berechnung der Vitalität im mitgeführten MTT-Test deutlich wurden. Wie schon in Kapitel 9.2.3 erwähnt, handelte es sich dabei um eine Methode zur Bestimmung von Lebendzellzahl-Äquivalenten. Niedrige Absorptionswerte stehen also für eine geringe Zahl lebender Zellen. Somit wurden alle Substanzen, mit niedriger MTT-Absorption (Zellvitalität unter 40 %) von der weiteren Testung ausgeschlossen, obwohl sie die Einschlusskriterien hinsichtlich der Regulation der Luciferase-Aktivität erfüllten. Dies traf auf die Substanzen E 5, FL 15, FL 16, FL 38, FL 44, FL 56, LEYS 530, Lovastatin, PARCL, PARFLU und Simvastatin zu.

Nach Betrachtung der Ergebnisse wurden die Substanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, LEYS 517 als Induktoren und Atorvastatin als Suppressor zur weiteren Testung herangezogen.

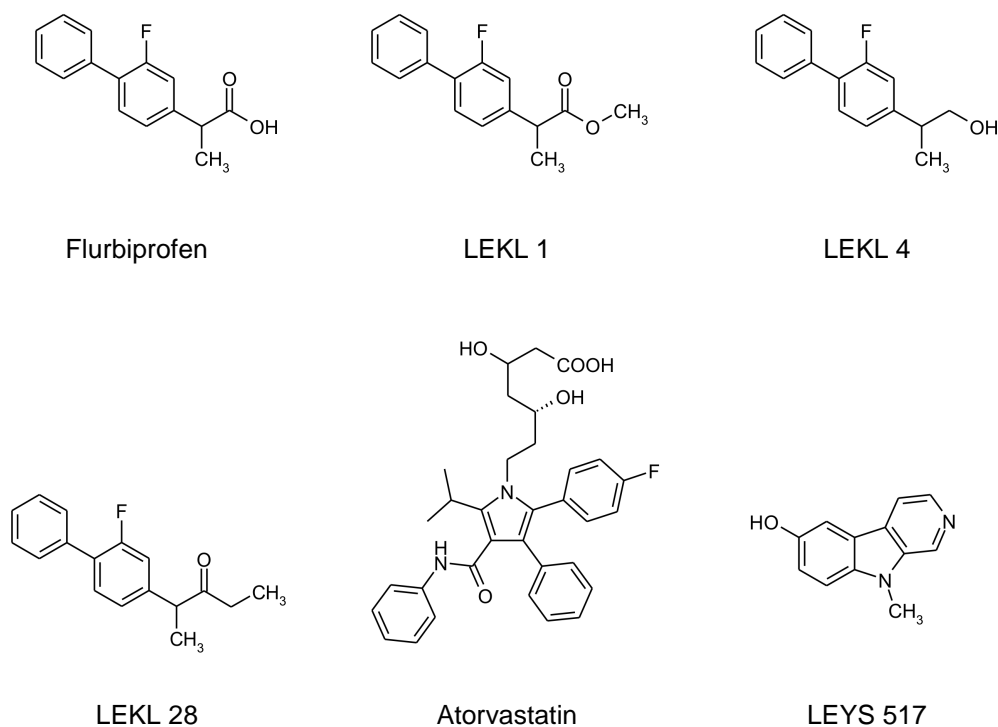
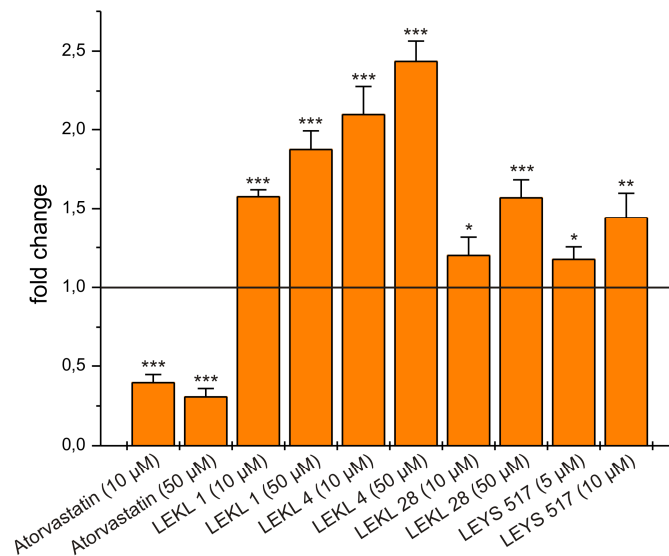


Abbildung 28: Strukturformeln der zur weiteren Testung im Luciferase-Reporterergen-Assay ausgewählten Reinsubstanzen.

Die Substanzen LEKL 1, LEKL 4 und LEKL 28 sind Derivate des nichtsteroidalen Antirheumatikums Flurbiprofen. Es handelt sich bei LEKL 1 um einen Methylester, bei LEKL 4 um einen Alkohol und bei LEKL 28 um ein Ethylketon des Flurbiprofens (Abbildung 28). Atorvastatin wird in die Arzneistoffgruppe der Statine eingeordnet, welche zur Therapie der Hypercholesterinämie eingesetzt werden. Diese senken durch eine Hemmung des Enzyms 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) die intrazelluläre Cholesterolkonzentration, worauf die Zelle mit einer erhöhten Bildung von LDL-Rezeptoren reagiert. Als Folge davon nimmt die Konzentration des Gesamtcholesteroles sowie der LDL-Partikel im Blut ab. Die Substanz LEYS 517 (Abbildung 28) gehört der Substanzgruppe der beta-Carboline an. Diese Substanzreihe wurde im Labor, mit dem Ziel neue AChE-Hemmer zu erhalten, synthetisiert.

In den folgenden Testreihen wurden die Zellen mit den ausgewählten Substanzen in den Konzentrationen 10 μM und 50 μM für 24 h inkubiert. Nach der Durchführung von drei voneinander unabhängigen Experimenten mit je einem Triplett ($n = 3$) war bei allen Substanzen eine statistisch signifikante Modulation der Reporterergen-Expression zu beobachten (Abbildung 29). Die exakten Werte sind dem Anhang in Tabelle A4 zu entnehmen.

**Abbildung 29:****Ergebnisse des Screenings der ausgewählten Reinsubstanzen im Luciferase-Reporter-Gen-Assay**

Darstellung der berechneten *fold changes* der Aktivität der Luciferase.

n = 3; ± SD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Im Zuge der Testung von 39 Reinsubstanzen konnten fünf Substanzen identifiziert werden, die im artifiziellen System des Luciferase-Reporter-Gen-Assays die Expression des Reportergens modulierten. Atorvastatin regulierte die Expression herunter, wohingegen die Substanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, LEYS 517 als Induktoren fungierten. Das Reportergen wurde konzentrationsabhängig durch die Substanzen reguliert (Abbildung 29).

18.1.2 Real-Time-RT-PCR: Reinsubstanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, LEYS 517 und Atorvastatin

Zur Untersuchung der Regulation der *APOE*-Expression wurden die Reinsubstanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, LEYS 517 und Atorvastatin herangezogen. Diese waren durch eine statistisch signifikante Regulation des Reportergens im Luciferase-Reporter-Gen-Assay mit stabil transfizierten Zellen aufgefallen (siehe Kapitel 18.1.1). Es fand eine Inkubation untransfizierter 1321N1-Zellen für 24 h mit den Substanzen in einer Konzentration von 50 µM statt (drei voneinander unabhängige Messungen zu je einem Duplett, n = 3).

Atorvastatin führte gemäß der inversen Regulation der *Luciferase* des Reporter-Gen-Assays und des nativen *APOE*-Gens zu einer statistisch signifikant induzierten *APOE*-mRNA-Expression (FC = 1,69 ± 0,25; p < 0,01; Student's t-Test).

Bei Behandlung der Zellen mit den Substanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, und LEYS 517, die im Screening als Induktoren der Luciferase-Aktivität aufgefallen waren, konnte festgestellt werden, dass es zwar in allen Fällen zu einer leichten, jedoch statistisch nicht signifikanten Repression der *APOE*-mRNA-Expression kam: Eine Inkubation der Zellen mit LEKL 1 resultierte in einer $FC = 0,89 \pm 0,39$, LEKL 4 in $FC = 0,76 \pm 0,25$ und LEKL 28 in $FC = 0,85 \pm 0,38$. Die Substanz LEYS 517 resultierte mit $FC = 0,91 \pm 0,32$ in der schwächsten Repression, die kaum noch messbar war (Abbildung 30).

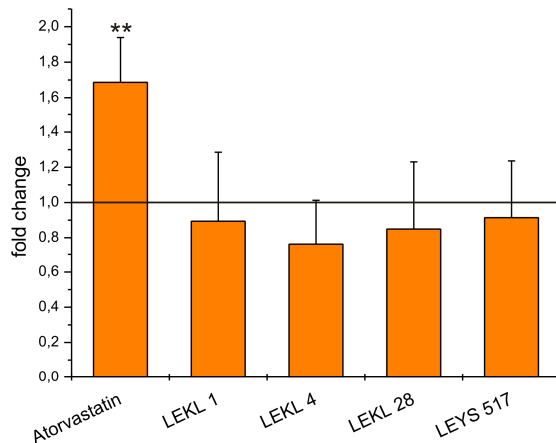


Abbildung 30:
Quantifizierung der *APOE*-mRNA:
Real-Time-RT-PCR nach Inkubation mit den Reinsubstanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, LEYS 517 und Atorvastatin

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach 24-stündiger Inkubation ($c = 50 \mu\text{M}$) der Zelllinie 1321N1.

$n = 3; \pm \text{SD}$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

(Student's t-Test)

Nichtsdestotrotz war der Trend der gegenläufigen Regulation zwischen Reporter-gen-Assay und *Real-Time-RT-PCR* auch für die getesteten Reinsubstanzen erkennbar.

18.2 TCM-Extrakte

Die Auswahl zu testender Drogen der Traditionellen Chinesischen Medizin richtete sich nach Indikationsgebieten. Angaben zur traditionellen Verwendung wurden sowohl dem „Leitfaden Chinesische Phytotherapie“ (Hempfen und Fischer, 2007) als auch dem „Arzneibuch der chinesischen Medizin“ (Stöger und Friedl, 2009) entnommen.

Da ApoE ein Transportprotein für Lipide ist und somit auch in direkter Verbindung mit Fettstoffwechselstörungen steht, wurden die Drogen *Curcumae longae tuber*, *Drynariae rhizoma* und *Polygonati rhizoma* ausgewählt, da diese traditionell zur Lipidsenkung angewendet werden. Des Weiteren wurden Drogen ausgewählt, die traditionell bei Störungen im ZNS bzw. von Nervenbahnen eingesetzt werden: *Gleditsiae fructus* ist bei epileptiformen Anfällen sowie Fazialisparesen und *Cynomorii herba* bei Paralysen und Parästhesien indiziert. Antikonvulsive, sedierende und hypnotische Eigenschaften sowie ZNS-Dämpfung werden den Drogen *Arisaematis rhizoma*, *Gardeniae fructus* und *Sappan lignum* zugeschrieben. Eine

dritte Gruppe von TCM-Drogen entstammte dem Bereich „antibiotische, antimykotische und antiphlogistische Wirkung“. Hier wurden die Extrakte der Drogen *Coptidis rhizoma*, *Sophorae (flavescentis) radix* und *Scutellariae radix* getestet. Letzterer Droge wird zusätzlich auch eine mild sedierende Wirkung nachgesagt.

18.2.1 Screening der TCM-Extrakte im Luciferase-Reporter-Gen-Assay

Zur Testung wurde von jeder Droge sowohl ein wässriger als auch ein methanolischer Extrakt nach den in Kapitel 13.1 beschriebenen Methoden erstellt. Das Screening der TCM-Extrakte wurde mit der Zelllinie 25037 Klon 8 durchgeführt. Getestet wurden alle in Tabelle 10 aufgeführten Extrakte. Die Testkonzentration betrug in allen Tests 50 µg/ml.

Nach dem ersten Testdurchlauf erfüllten zwei Extrakte die Einschlusskriterien $FC < 0,6$ oder $> 1,5$: TCM 9 W ($FC = 2,45$) und TCM 9 M ($FC = 1,99$). Die Extrakte TCM 3 M ($FC = 0,67$), TCM 6 M ($FC = 0,67$) und TCM 7 M ($FC = 0,69$) wurden in weitere Testreihen aufgenommen, da sie mit den *fold changes* nahe an der festgesetzten Grenze lagen. Aufgrund zytotoxischer Effekte wurden die Extrakte TCM 4 M, TCM 4 W, TCM 5 M und TCM 5 W trotz Erfüllung der Kriterien nicht erneut vermessen. Die Ergebnisse aller Extrakte sind im Anhang in Tabelle A5 dargestellt.

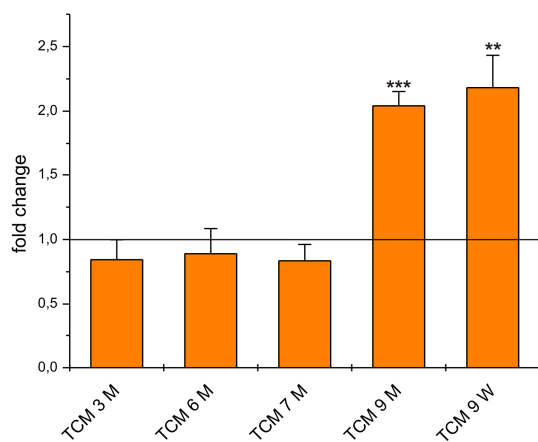


Abbildung 31:
Luciferase-Reporter-Gen-Assay der ausgewählten TCM-Extrakte

Ergebnisse des Screenings der fünf ausgewählten TCM-Extrakte ($c = 50 \mu\text{g/ml}$). Darstellung der berechneten *fold changes* der Aktivität der Luciferase von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Bezeichnung der Extrakte siehe Tabelle 19.

$n = 3; \pm \text{SD}$

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$
(Student's t-Test)

Die dreifache Inkubation der Zellen zeigte einen statistisch signifikanten induktiven Effekt der beiden Extrakte TCM 9 M ($FC = 2,04 \pm 0,11$; $p < 0,001$; Student's t-Test) und TCM 9 W ($FC = 2,18 \pm 0,25$; $p < 0,01$; Student's t-Test) auf die Luciferase-Aktivität. Wie aus Abbildung 31 ersichtlich wird, war der repressive Effekt der Extrakte TCM 3 M, TCM 6 M und TCM 7 M mit $p > 0,05$ nicht statistisch signifikant.

Tabelle 10:

Getestete Extrakte aus Drogen der Traditionellen Chinesischen Medizin

Interne Bezeichnung	Pflanze	Drogenbezeichnung	Auszugs-mittel
TCM 1 W	<i>Arisaema erubescens</i> (Wall.) Schott, Araceae	Arisaematis rhizoma	Wasser
TCM 1 M	<i>Arisaema erubescens</i> (Wall.) Schott, Araceae	Arisaematis rhizoma	Methanol
TCM 2 W	<i>Curcuma wenyujin</i> Y.H. Chen et C. Ling., Zingiberaceae	Curcumae longae tuber	Wasser
TCM 2 M	<i>Curcuma wenyujin</i> Y.H. Chen et C. Ling., Zingiberaceae	Curcumae longae tuber	Methanol
TCM 3 W	<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Sm., Polypodiaceae	Drynariae rhizoma	Wasser
TCM 3 M	<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Sm., Polypodiaceae	Drynariae rhizoma	Methanol
TCM 4 W	<i>Gleditsia sinensis</i> LAM., Fabaceae	Gleditsiae fructus	Wasser
TCM 4 M	<i>Gleditsia sinensis</i> LAM., Fabaceae	Gleditsiae fructus	Methanol
TCM 5 W	<i>Caesalpinia sappan</i> L., Caesalpinaceae	Sappan lignum	Wasser
TCM 5 M	<i>Caesalpinia sappan</i> L., Caesalpinaceae	Sappan lignum	Methanol
TCM 6 W	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red., Liliaceae	Polygonati rhizoma	Wasser
TCM 6 M	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red., Liliaceae	Polygonati rhizoma	Methanol
TCM 7 W	<i>Cynomorium songaricum</i> Rupr., Cynomoriaceae	Cynomorii herba	Wasser
TCM 7 M	<i>Cynomorium songaricum</i> Rupr., Cynomoriaceae	Cynomorii herba	Methanol
TCM 8 W	<i>Coptis chinensis</i> Franch, Ranunculaceae	Coptidis rhizoma	Wasser
TCM 8 M	<i>Coptis chinensis</i> Franch, Ranunculaceae	Coptidis rhizoma	Methanol
TCM 9 W	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi, Lamiaceae	Scutellariae radix	Wasser
TCM 9 M	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi, Lamiaceae	Scutellariae radix	Methanol
TCM 10 W	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis, Rubiaceae	Gardeniae fructus	Wasser
TCM 10 M	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis, Rubiaceae	Gardeniae fructus	Methanol
TCM 11 W	<i>Sophora flavescens</i> Ait., Fabaceae	Sophorae (flavescentis) radix	Wasser
TCM 11 M	<i>Sophora flavescens</i> Ait., Fabaceae	Sophorae (flavescentis) radix	Methanol

18.2.2 Real-Time-RT-PCR: TCM 9 M und TCM 9 W (*Scutellariae radix*)

Die im Screening aufgefallenen Extrakte TCM 9 M und TCM 9 W der TCM-Droge *Scutellariae radix* (Pflanze: *Scutellaria baicalensis* Georgi, Lamiaceae) wurden auf *APOE*-modulierende Eigenschaften anhand von *Real-Time*-RT-PCR-Messungen untersucht.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, wie bei der Untersuchung der LEKL-Reinsubstanzen (Kapitel 18.1.2), dass eine 24-stündige Inkubation untransfizierter 1321N1-Astrozytomzellen weder mit dem methanolischem Extrakt TCM 9 M ($FC = 0,95 \pm 0,14$) noch mit dem

wässrigen Extrakt TCM 9 W ($FC = 0,90 \pm 0,09$) in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ zu einer statistisch signifikanten Regulation der *APOE*-mRNA-Expression führte (Abbildung 32).

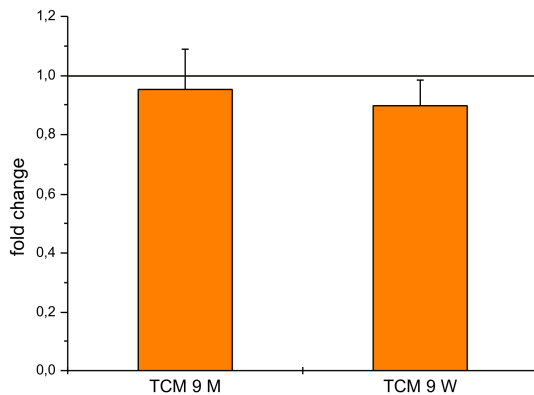


Abbildung 32:
Quantifizierung der *APOE*-mRNA:
Real-Time-RT-PCR nach Inkubation mit den
 TCM-Extrakten TCM 9 M und TCM 9 W
 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach 24-
 stündiger Inkubation ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) der Zelllinie
 1321N1.
 $n = 3$; \pm SD (Student's t-Test)

18.3 Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung

Im Rahmen des Screenings nach *APOE*-mRNA-modulierenden Substanzen wurden 63 Pflanzenextrakte getestet, deren Drogenausgangsmaterial im Jahr 2006 im Inselstaat Vanuatu nach pharmakologischen Gesichtspunkten gesammelt wurde. Auf den drei Inseln Ambrym, Aneityum und Loh (Torres Islands) wurden insgesamt 18 Pflanzen mit potentiell immunomodulatorischen Eigenschaften gesammelt und noch vor Ort getrocknet. Eine Extraktion des Drogenmaterials erfolgte mittels beschleunigter Lösungsmittlextraktion. Durch die aufeinander folgende Extraktion desselben Drogenmaterials mit Dichlormethan, Ethylacetat und Methanol konnten für jede Pflanzenprobe drei Extrakte verschiedener Lipophilie erhalten werden. Eine genaue Beschreibung der Auswahl der Pflanzen sowie von Sammlung und Extraktion des Drogenmaterials ist bei Bradacs (2008a) nachzulesen.

Das Screening der Extrakte (Tabelle 4, Kapitel 5.16) wurde mit der Zelllinie 25027 Klon J durchgeführt. Die Testkonzentration betrug $50 \mu\text{g/ml}$. Nach dem ersten Durchgang erfüllten 13 Extrakte die Einschlusskriterien $FC < 0,6$ oder $> 1,5$ und wurden einer erneuten Testung unterzogen (Tabelle 11). Die Extrakte 0476-1.6 B, 0276-1 B und 0186-12 C wurden in weitere Testreihen mit aufgenommen, da deren Werte am Grenzwert von 0,6 lagen. Die FC-Werte der Testung aller Extrakte sind im Anhang in Tabelle A6 dargestellt.

Tabelle 11:

Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung, die im Luciferase-Reportergen-Assays (Zelllinie 25027 Klon J) die Einschlusskriterien ($FC < 0,6$ oder $FC > 1,5$) nach einmaliger Vermessung erfüllten.

	Extrakt	Pflanze, Familie	Verwendetes Pflanzenteil	Auszugsmittel
1	0476-1.2 B	<i>Aidia racemosa</i> (CAV.) D.D. TIRVENG., Rubiaceae	Blätter	Ethylacetat
2	0476-1.6 A	<i>Dysoxylum arborescens</i> (BL.) MIQ., Meliaceae	Blätter	Dichlormethan
3	0476-1.6 B	<i>Dysoxylum arborescens</i> (BL.) MIQ., Meliaceae	Blätter	Ethylacetat
4	2966-2 B	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM. I, Apocynaceae	Blätter	Ethylacetat
5	2966-2 C	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM. I, Apocynaceae	Blätter	Methanol
6	2576-10 A	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM. II, Apocynaceae	Blätter	Dichlormethan
7	2576-10 B	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM. II, Apocynaceae	Blätter	Ethylacetat
8	2576-10 C	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> LAM. II, Apocynaceae	Blätter	Methanol
9	2576-4 A	<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) SM., Zingiberaceae	Rhizom	Dichlormethan
10	2576-4 B	<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) SM., Zingiberaceae	Rhizom	Ethylacetat
11	0276-1 B	<i>Euodia latifolia</i> DC., Rutaceae	Blätter	Ethylacetat
12	2176-7L1 A	<i>Macaranga tanarius</i> (L.) MUELL.ARG, Euphorbiaceae	Innere Rinde Blätter	Dichlormethan
13	0186-12 C	<i>Dracontomelon vitiense</i> ENGL., Anacardiaceae	Innere Rinde	Methanol

Nach Betrachtung der Ergebnisse von drei voneinander unabhängigen Messungen (Abbildung 33) wurde die Pflanze *T. pandacaqui* II (2576-10) zur weiteren Bearbeitung (aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Extraktes) ausgewählt, da sie mit einem $FC = 4,09 \pm 0,26$ durch den Dichlormethanextrakt und $3,5723 \pm 0,3328$ durch den Methanolextrakt die stärkste Induktion der Reportergen-Expression bewirkte. Ebenso zeigten auch der Ethylacetatextrakt und der Methanolextrakt der Pflanze *T. pandacaqui* I mit $FC = 1,48 \pm 0,06$ und $FC = 2,32 \pm 0,13$ eine statistisch signifikante Induktion. Die Unterschiede der *T.-pandacaqui*-Extrakte liegen im Standort der Pflanze. So wurde das Drogenausgangsmaterial der Pflanze *T. pandacaqui* I in Lungharigi, Loh, Torres Islands, Vanuatu, und der Pflanze *T. pandacaqui* II in Lélé, Ambrym, Vanuatu, gesammelt.

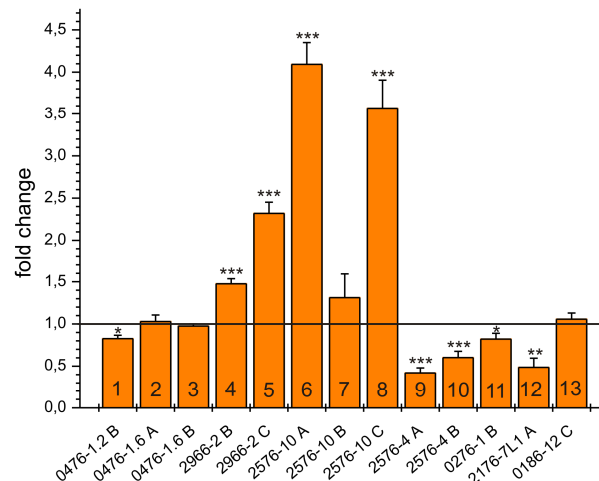


Abbildung 33:

Ergebnisse des Screenings der 13 ausgewählten Extrakte der Vanuatu-Wildsammlung

Darstellung der berechneten FC-Werte (Luciferase-Aktivität) nach 24-stündiger Inkubation (Testkonzentration 50 µg/ml). Nummerierung siehe Tabelle 11.

n = 3; ± SD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (Student's t-Test)

Insgesamt führten fünf Extrakte zu einer statistisch signifikanten Repression des Reportergens: 0476-1.2 B, 2576-4 A, 2576-4 B, 0276-1 B und 2176-7L1 A. Als nicht statistisch signifikant wurden die Regulationen der Extrakte 0476-1.6 A, 0476-1.6 B, 2576-10 B und 0186-12 C eingestuft. Alle ermittelten FC-Werte sind in Tabelle A7 im Anhang dargestellt.

19 Molekulargenetische Identitätsprüfung – Sequenzanalyse der ITS-Region von *T. pandacaqui*

Gerade bei Pflanzen, die einer Wildsammlung entstammen, ist es wichtig, neben der morphologischen Bestimmung auch eine molekulargenetische Identitätsprüfung durchführen zu können, um eine schnelle Identifizierung des Pflanzenmaterials bei späteren Sammlungen zu gewährleisten. Die erhaltene Droge der Pflanze *T. pandacaqui* wurde zwar bei der Sammlung im Inselstaat Vanuatu direkt im Feld, im National Herbarium in Port Vila (Vanuatu) und in den Royal Botanic Gardens (Kew, London, Großbritannien) morphologisch auf Identität geprüft (Bradacs, 2008a). Jedoch waren in Datenbanken (GenBank) noch keine Sequenzen zur molekulargenetischen Identitätsprüfung genutzter, artspezifisch variabler DNA-Abschnitte zu finden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Sequenzanalyse der

ITS-Region durchgeführt. Wie in Kapitel 12.1 beschrieben, fand eine Isolierung genomischer DNA aus getrocknetem Drogenmaterial (Blätter) von *T. pandacqui* II statt. Mit Hilfe der Primer Ker010-F und Ker012-R wurde die ITS-Region mittels PCR, wie in Kapitel 12.2 beschrieben, amplifiziert und die Sequenz des PCR-Produkts bestimmt. Im Anschluss wurde die erhaltene Sequenz mit anderen Sequenzen der Datenbank (GenBank) verglichen.

T.pan	1	TCGAATCCTGCGAAGCAGACGACCCGCGAACTCG-TTCT-ACACCGGGCATAGGTCGGGG	58
R.cam	1A.....A.....T.T....A..TG.....---.C.....T	56
T.pan	59	GTCTCCCTCGGCCGTTG-CCCCCGGCCGCGGTGCCCTCTCGGGGGCTCCCGGCCGT	117
R.cam	57	.C..T.GGG..C....C.T.....-...-...-...T....T.....	112
T.pan	118	G-CAAACCAACAAAACCCGCGCGGAAAGCGCCAAGGACTACTTAAAAACGGAATGCCT	176
R.cam	113	.C.G..-...-...-...-...-...-...-G.....C.....	168
T.pan	177	TCCCTCGGCCCTGCCCGTTTCGCGGTGCGGGTC-TCGGGAGC-AAGGGCGCTGTCTGAATA	234
R.cam	169T.....T..C.G.-.....G.-.....C	226
T.pan	235	CTGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAC	294
R.cam	227	.AA.....	286
T.pan	295	GCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGC	354
R.cam	287	346
T.pan	355	GCCCGAAGCCACTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTGCCTCC	414
R.cam	347T.....	406
T.pan	415	CCTCCCCCTTCCATTCTTCTGTGTTGGAACGGGGGGCCG-TGCGGGGGAGGGCGGAAAA	473
R.cam	407	..A....T.GA..-..AAA.-.-.-...-...G.....-...G.C	454
T.pan	474	TGGCCTCCCGTGCTAAC-C-CGCGGCCGCGCTAAACCCCGGTCCCCAGCCATGGACGTCA	531
R.cam	455G-.G.G.....TT.....C.T.GC....T...	513
T.pan	532	CGACAAGTGGTGGTTGAAACCCTCAACTCGATTGCGAGTCGTGC-G-ACGCCCCGTGGCC	589
R.cam	514A.....C.G.A-...-C.....	571
T.pan	590	GGG-AGACCGATCGACCCTCTAGCGAGCC	617
R.cam	572	...G..G....A.....C.C.....	600

T.pan = *Tabernaemontana pandacqui* LAM.(II) ITS 1-Gen
R.cam = *Rauvolfia cambodiana* Pierre ex Pit. 5.8S-RNA-Gen
(Genbank AB376674) ITS2 -Gen

Abbildung 34:

Sequenzvergleich der ITS-Region von *T. pandacqui*

Sequenzvergleich der durch Sequenzierung erhaltenen ITS-Region der Pflanze *Tabernaemontana pandacqui* LAM. II mit der ITS-Region der Pflanze *Rauvolfia cambodiana* Pierre ex Pit. (Genbank AB76674).

Da für die Art und Gattung zum Zeitpunkt der Sequenzanalyse noch keine ITS-Sequenzen bei GenBank vorlagen, wurde nach einem BLAST-Sequenzvergleich in einer nach absteigender Übereinstimmung geordneten Rangliste die ITS-Region der Pflanze *Rauvolfia cambodiana* Pierre ex Pit. als nächst-ähnliche Sequenz erkannt (97 % Sequenzabdeckung, 85 % Identität). Auch die in der Rangliste folgenden Arten sind Vertreter der gleichen Familie und Unterfamilie (Rauvolfioideae).

Bekanntermaßen unterscheiden sich die ITS-Region 1 und 2 selbst innerhalb der Gattung mitunter deutlich. Innerhalb der Unterfamilie und nachfolgend der Familie nehmen Sequenzabweichungen zu, die Sequenz des 5,8S-rRNA-Gens bleibt jedoch konstant. Beim Vergleich übergeordneter Taxa sind jedoch auch hier Unterschiede bekannt. Aufgrund der Zuordnung der Pflanze via ITS-Vergleich zur erwarteten Familie und gar Unterfamilie kann von einer verlässlichen Sequenzbestimmung ausgegangen werden. Dafür spricht auch, dass zwei verschiedene PCR-Produkte einmal vom 5'- und einmal vom 3'-Ende sequenziert wurden, und beide Sequenzen 100%ige Übereinstimmung aufwiesen. Die Sequenz kann nun als Referenz für nachfolgende Identitätsprüfungen verwendet werden.

Das Drogenmaterial des Standorts I (Lungharigi, Loh, Torres Islands) wurde ebenfalls einer Sequenzanalyse der ITS-Region unterzogen. Beide Sequenzen waren mit Ausnahme von acht Basen identisch. In der Sequenz der Pflanze von Standort I wurde hier jeweils ein Gemisch von zwei Basen identifiziert, wobei eine der beiden Basen jeweils mit der korrespondierenden von Standort II identisch war (Abbildung A4, Anhang).

20 Aktive Verbindungen aus *T. pandacaqui*

Im Luciferase-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten 1321N1-Zellen konnte eine induzierte Expression des Reportergens durch die Extrakte aus Blättern von *T. pandacaqui* I und II (2966-2 und 2576-10) beobachtet werden (siehe Kapitel 18.3).

Um aktive Extraktkomponenten isolieren zu können, wurde eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung des methanolischen Extrakts der Pflanze II durchgeführt. Nach jedem Extraktionsschritt fand eine Testung der erhaltenen Fraktionen auf *APOE*-modulierende Eigenschaften statt. Zeigte eine Fraktion Aktivität, wurde sie zur weiteren Bearbeitung herangezogen. Im Fall mehrerer aktiver Fraktionen, wurde diejenige mit dem größten Massenanteil ausgewählt.

Die Testung der Fraktionen wurde im Luciferase-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten 1321N1-Zellen (Zelllinie 25037 Klon 8) durchgeführt. Die Fraktionen fanden in einer Testkonzentration von 50 µg/ml Einsatz. DMSO (Endkonzentration 0,1 %) wurde als Kontrolle verwendet. Da es hier nicht um eine statistisch abgesicherte Berechnung von FC-Werten, sondern lediglich um die Erkennung einer Aktivität der einzelnen Fraktionen ging, wurden diese nur einmal gemessen.

20.1 Extraktgewinnung mittels beschleunigter Lösungsmittlextraktion (ASE)

Um für die aktivitätsgeleitete Fraktionierung Ausgangsextrakte verschiedener Lipophilie zu erhalten, wurden 305,7 g in einer Zentrifugalmühle (Siebgröße 0,5 mm) zerkleinerte, getrocknete Droge (Blätter) unter Verwendung der ASE[®] 100-Anlage (Dionex), wie in Kapitel 13.2 beschrieben, extrahiert. Mittels dieser Extraktionsmethode war es möglich, drei sich in der Lipophilie unterscheidende Extrakte desselben Drogenmaterials zu gewinnen. Dichlormethan (Extrakt A 1) diente als erstes Lösungsmittel zur Gewinnung eines Extraktes mit lipophilen Bestandteilen. Danach wurde das Drogenmaterial mit Ethylacetat (Extrakt A 2) extrahiert und zuletzt mit Methanol (Extrakt A 3), was zu einem Extrakt mit hydrophilen Komponenten führte. Der Ethylacetatextrakt liegt in seiner Lipophilie zwischen den beiden anderen Extrakten. Nach dem Entfernen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck, wurde die Ausbeute (Tabelle 12) bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung der gewonnenen Extrakte wurden diese zum einen im Luciferase-Reporter-Gen-Assay mit stabil transfizierten Zellen (Zelllinie 25037 Klon 8) auf Aktivität geprüft, und zum anderen mittels Dünnschichtchromatographie untersucht (Tabelle 12, Abbildung 35).

Tabelle 12:

Ausbeute der Extraktion sowie der *fold changes* (Aktivität der Luciferase) und der im MTT-Test ermittelten Vitalität [%] der getesteten ASE-Extrakte der Pflanze *T. pandacaqui* im Luciferase-Assay mit stabil transfizierten Zellen (25037 Klon 8).

Extrakt	Ausbeute [mg]	<i>fold change</i>	Vitalität [%]
A 1	25907	4,15	66,53
A 2	1490	2,24	90,46
A 3	32890	3,71	80,81

Zur dünn-schichtchromatographischen Untersuchung der erhaltenen Extrakte wurden 5 bzw. 10 µl einer 1%igen Lösung auf die DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) aufgetragen und diese in den Fließmittelsystemen DC 1, DC 2, DC 3 und DC 4 entwickelt. Im Anschluss wurden die Platten mit Anisaldehyd, Naturstoffreagenz/Macrolog 400 und Dragendorff-Reagenz besprüht.

Nach Betrachten der entwickelten DC-Platten wurde der methanolische Extrakt zur weiteren Fraktionierung ausgewählt, obwohl der Dichlormethanextrakt eine etwas höhere Aktivität im Luciferase-Assay aufwies. Grund hierfür waren die Zusammensetzung der Extrakte und die bei Behandlung mit dem DCM-Extrakt deutlich verminderte Zellvitalität.

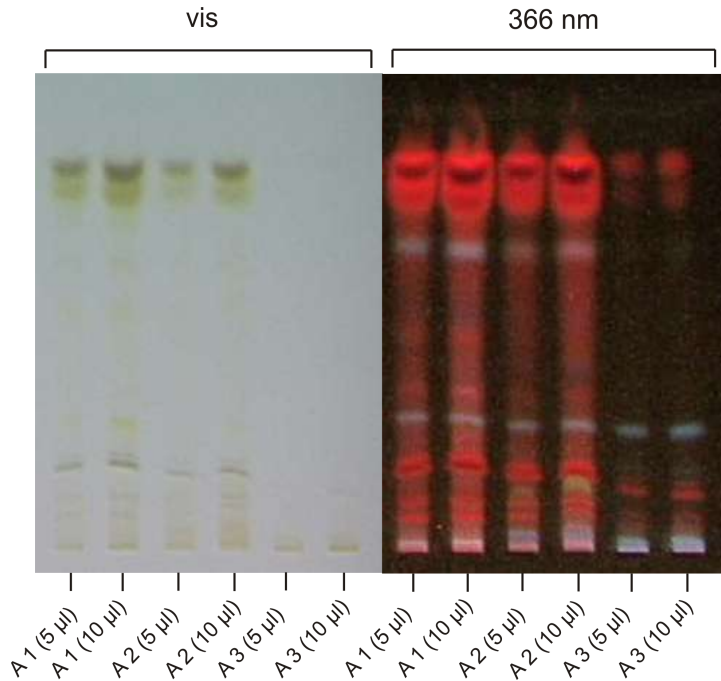


Abbildung 35:
Dünnschichtchromatogramme der
Extrakte A 1, A 2 und A 3
 Dünnschichtchromatogramme
 (Normalphase) der mittels ASE
 gewonnenen Extrakte A 1, A 2 und
 A 3 der Pflanze *T. pandacacui*,
 aufgenommen bei Tageslicht (vis)
 und bei 366 nm, Fließmittel DC 4.

Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, zeigte der DCM-Extrakt (A 1) breite Chlorophyll-Banden, welche bei Tageslichtbetrachtung (vis) als grüne Banden und bei 366 nm als rote Banden zu erkennen waren. Da sich dieses bei der Fraktionierung als störend erweisen kann, fiel die Wahl auf den Methanolextrakt (A 3), welcher mit einer FC = 3,71 eine annähernd so hohe Aktivität wie der DCM-Extrakt A 1 (FC = 4,15) hatte, aber weitaus weniger Chlorophyll enthielt.

20.2 Isolierung der Alkaloidfraktion aus *T. pandacacui* und Testung auf *APOE*-modulierende Aktivität

Die bisherigen Untersuchungen der Extrakte der Pflanze *T. pandacacui* hatten ihren Fokus auf der Alkaloidfraktion des Extrakts. Wie schon in Kapitel 3.4 erwähnt, konnten die durch Taesotikul *et al.* beschriebenen Wirkungen wie ZNS-dämpfende sowie anti-inflammatorische, antipyretische und antinozizeptive Eigenschaften der Alkaloidfraktion zugeordnet werden. Um die Frage zu klären, ob die *APOE*-mRNA-modulierende Aktivität der *T. pandacacui*-Extrakte auch den Alkaloiden zuzuschreiben ist, fand eine Isolierung der Alkaloidfraktion des aktiven Dichlormethanextrakts A 1, wie in Kapitel 13.3 beschrieben, statt.

Durch Säure-Base-Extraktion von 5,0 g des ASE-Extraktes A 1 (Kapitel 20.1) konnten 20,14 mg Alkaloidfraktion gewonnen werden. Es wurden sowohl der Dichlormethanextrakt

nach Alkaloidextraktion als auch die gewonnenen Alkaloide mittels Dünnschichtchromatographie (Normalphase) näher untersucht.

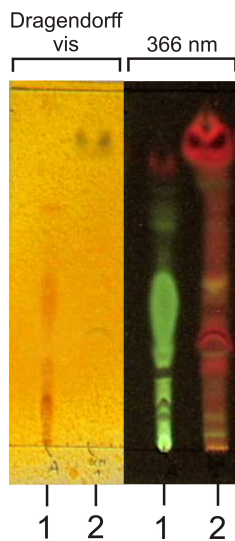


Abbildung 36:
Dünnschichtchromatogramme der Alkaloidfraktion aus *T. pandacaqui*

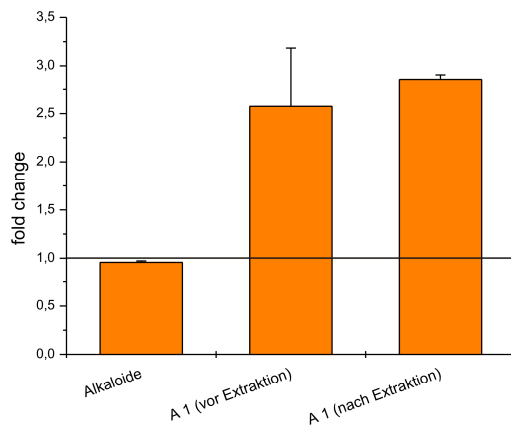
Dünnschichtchromatogramme (Normalphase) der mittels Säure-Base-Extraktion aus dem Dichlormethanextrakt A 1 gewonnenen Alkaloidfraktion der Pflanze *T. pandacaqui*, aufgenommen bei 366 nm und nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz bei Tageslicht (vis), Fließmittel DC 4.

1 = Alkaloidfraktion
2 = DCM-Extrakt nach Alkaloidextraktion

In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass es möglich war, durch Säure-Base-Extraktion die Alkaloide des DCM-Extraktes zu isolieren. Nach Besprühen mit Dragendorff-Reagenz konnten die Banden in Spur 1 (vis) eindeutig als Alkaloide identifiziert werden. Betrachtet man die DC-Platte bei 366 nm, ist zu sehen, dass es zu leichten Verunreinigungen der Alkaloidfraktion unter anderem durch Chlorophyll, erkennbar als rote Bande, kam.

Die Alkaloidfraktion wurde auf *APOE*-modulierende Aktivität im Luciferase-Reportergen-Assay und mittels *Real-Time*-RT-PCR untersucht. Um den Einfluss auf die *APOE*-Expression zu testen, wurden Zellen der Zelllinie 1321N1 über 24 h mit der Alkaloidfraktion in einer Konzentration von 50 µg/ml inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Total-RNA isoliert (siehe Kapitel 9.1.5). Eine relative Quantifizierung der *APOE*-mRNA bezogen auf *GAPDH*-mRNA mit Hilfe von *Real-Time*-RT-PCR-Messungen wurde, wie in Kapitel 10.3 beschrieben, durchgeführt. Die Berechnung der *fold changes* dreier voneinander unabhängiger Messungen zu je einem Duplett ergab einen Wert von $FC = 0,98 \pm 0,03$. Die Alkaloide der Extraktfraktion A 1 scheinen die *APOE*-Expression also nicht zu beeinflussen.

Dieser Sachverhalt bestätigte sich auch im Luciferase-Reportergen-Assay mit stabil transfizierten 1321N1-Zellen. Zur Testung wurde die stabile Zelllinie 25037 Klon 8 verwendet. Die Durchführung fand wie in Kapitel 9.2.2 beschrieben statt. Auch in diesem Testsystem zeigte die Alkaloidfraktion keinerlei Aktivität (Abbildung 37): $FC = 0,96 \pm 0,01$ ($n = 2$).

**Abbildung 37:****Luciferase-Reportergen-Assay der Alkaloidfraktion des Dichlormethanextrakts A 1**

Ergebnisse des Luciferase-Reportergen-Assays der Alkaloidfraktion und der Extrakts A 1 sowohl vor als auch nach der Alkaloidextraktion mit Testkonzentration $c = 50 \mu\text{g/ml}$. Darstellung der berechneten *fold changes* der Aktivität der Luciferase von zwei voneinander unabhängigen Experimente.

$n = 2; \pm \text{SD}$

Um die Aktivität eindeutig zuordnen zu können, wurden die Zellen neben der Alkaloidfraktion auch mit dem Dichlormethanextrakt A 1 sowie diesem Extrakt nach der Alkaloidextraktion inkubiert, und die Aktivität der Luciferase im Anschluss daran gemessen. Durch das Entfernen der Alkaloide aus dem Extrakt kam es zu keinerlei Aktivitätseinbußen: Extrakt A 1 (vor Alkaloidextraktion) resultierte in einem $\text{FC} = 2,58 \pm 0,61$ und der Extrakt A 1 (nach Extraktion) in einem $\text{FC} = 2,85 \pm 0,06$ ($n = 2$). Mit diesen Versuchen konnte also gezeigt werden, dass die Aktivität der *T.-pandacqui*-Extrakte nicht auf die Alkaloidfraktion zurückzuführen ist.

20.3 Aktivitätsgeleitete Fraktionierung des methanolischen Extrakts A 3

Zur Identifizierung der Wirkprinzipien für die *APOE*-Regulation durch Extrakte aus *T. pandacqui* erfolgte eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung des methanolischen Extrakts A 3. Dieser wurde zunächst mit Hilfe eines Scheidetrichters gegen drei verschiedene Lösungsmittel (Dichlormethan, Ethylacetat und Butanol) ausgeschüttelt, und im Anschluss daran die Fraktionen auf Aktivität überprüft. Die aktive Dichlormethanfraktion B 1 wurde danach über eine Kieselgel-Vakuumsäule in 12 Fraktionen geteilt, wovon sich fünf (C 1, C 2, C 5, C 6 und C 10) als aktiv erwiesen. Die mit 87,3 mg mengenmäßig am stärksten vertretene Fraktion C 6 wurde anschließend über eine offene Kieselgelsäule gereinigt. Von 14 resultierenden Fraktionen zeigten fünf eine messbare Aktivität (D 3 – D 7). D 5 wurde nun über eine Sephadex[®] LH-20-Säule in sechs Fraktionen aufgereinigt. Die aktive Fraktion E 3 konnte über einen Methanol-Wasser-Gradienten durch Umkehrphasen-HPLC (RP-18) in neun weitere Fraktionen unterteilt werden. Die Fraktion G 6 wurde erneut durch HPLC gereinigt, wobei die Fraktionen G 6-1 bis G 6-6 erhalten wurden. Die Fraktionen G 6-4 und G 6-5 sowie

G 7, bei denen es sich um Reinsubstanzen handeln dürfte, wurden zur Strukturaufklärung mittels NMR ausgewählt, die bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht abgeschlossen war.

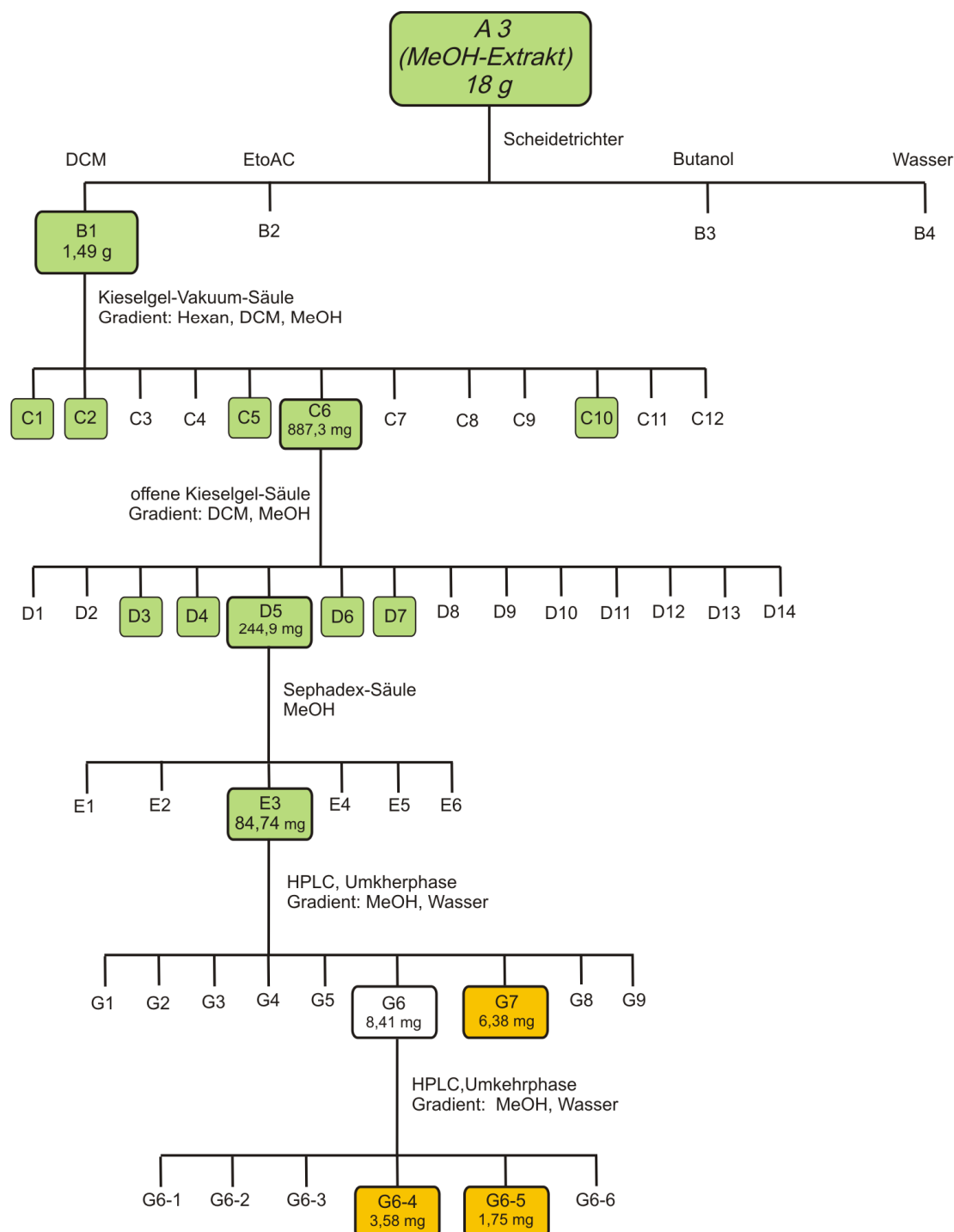


Abbildung 38:

Übersichtsschema der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des methanolischen Extrakts A 3 (*T. pandacqui*)

Im Luciferase-Assay mit stabil transfizierten Zellen (25037 Klon 8) als aktiv getestete Fraktionen sind grün unterlegt. Von gelb hinterlegten Fraktionen ist eine Strukturaufklärung in Arbeit.

20.3.1 Scheidetrichter (Fraktion A 3)

Mit dem Ziel einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des methanolischen Extraktes A 3 erfolgte zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion des in einem MeOH-Wasser-Gemisch gelösten Extraktes mit drei Lösungsmitteln verschiedener Lipophilie. Dafür wurden insgesamt 18 g A 3 in wenigen Millilitern Methanol gelöst und mit demineralisiertem Wasser versetzt, so dass ein Verhältnis MeOH – Wasser von 20 – 80 vorlag. Insgesamt wurde dreimal pro Lösungsmittel in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt und die Phasen getrennt. Um lipophile Bestandteile des methanolischen Extrakts in einer Fraktion zu vereinigen, wurde zuerst gegen Dichlormethan (B 1) ausgeschüttelt, für weniger lipophile Komponenten wurde Ethylacetat (B 2) verwendet, und im Anschluss daran Butanol (B 3). Hydrophile Extraktbestandteile verblieben in der wässrigen Phase (B 4). Im Zelltest erwies sich lediglich Fraktion B 1 mit $FC = 3,95$ als aktiv und wurde somit zur weiteren Fraktionierung verwendet (Tabelle 13).

Tabelle 13:

Kenngrößen der Fraktionen B 1 – B 4 (Scheidetrichter A 3): Ausbeute, Luciferase-Aktivität ($c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8) und Zellvitalität (MTT-Test, $c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8).

Extrakt	Ausbeute [mg]	<i>fold change</i> (Aktivität der Luciferase)	Vitalität [%]
B 1	1490	3,85	66,48
B 2	750	1,16	108,15
B 3	4280	1,17	108,45
B 4	7960	1,17	101,58

20.3.2 Kieselgelvakuumsäule (Fraktion B 1)

Die Fraktion B 1 wurde nun, wie in Kapitel 13.4.3.1 beschrieben, über eine Kieselgelvakuumsäule gereinigt. Hierzu wurden insgesamt 10 verschiedene Fließmittelkombinationen zunehmender Polarität eingesetzt. Die erhaltenen Fraktionen konnten nach Analyse mittels Dünnschichtchromatographie zu 12 größeren Fraktionen (C 1 – C 12) vereinigt werden. Als aktiv im Luciferase-Reportergen-Assay stellten sich die Fraktionen C 1, C 2, C 5, C 6 und C 10 heraus (Tabelle 14). Die mit 887,3 mg mengenmäßig größte Fraktion C 6 bewirkte die stärkste Induktion der Luciferase-Aktivität und wurde somit zur Weiterbearbeitung verwendet.

Tabelle 14:

Kenngrößen der Fraktionen C 1 – C 12 (Kieselgelvakuumsäule, Fraktion B 1): Ausbeute, Luciferase-Aktivität ($c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8) und Zellvitalität (MTT-Test, $c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8).

Fraktion	Ausbeute [mg]	<i>fold change</i> (Aktivität der Luciferase)	Vitalität [%]
C 1	10,43	1,84	104,16
C 2	18,92	1,63	102,20
C 3	6,03	1,21	105,39
C 4	11,84	1,06	105,64
C 5	8,88	1,75	101,38
C 6	887,34	3,80	63,83
C 7	78,26	1,16	82,38
C 8	46,62	1,11	86,31
C 9	106,56	1,03	98,73
C 10	20,09	2,51	67,26
C 11	25,33	0,99	96,07
C 12	43,84	1,36	86,82

20.3.3 Offene Kieselgelsäule (Fraktion C 6)

Im nächsten Schritt fand eine Fraktionierung von C 6 über eine offene Kieselgelsäule statt.

Tabelle 15:

Kenngrößen der Fraktionen D 1 – C 14 (offene Kieselgelsäule, Fraktion C 6): Ausbeute, Luciferase-Aktivität ($c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8) und Zellvitalität (MTT-Test, $c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8).

Fraktion	Ausbeute [mg]	<i>fold change</i>	Vitalität [%]
D 1	30,95	1,11	97,46
D 2	21,37	1,56	71,05
D 3	50,62	4,76	57,40
D 4	15,79	4,89	62,99
D 5	244,86	3,31	87,72
D 6	63,69	2,06	90,12
D 7	53,10	2,42	76,66
D 8	42,86	0,77	70,47
D 9	38,92	1,06	82,51
D 10	15,75	1,12	88,02
D 11	27,17	1,00	93,15
D 12	28,05	1,02	86,72
D 13	16,16	0,87	100,81
D 14	155,67	1,04	109,48

Die nach der in Kapitel 13.4.3.1 beschriebenen Methode erhaltenen 150 Fraktionen konnten nach DC-Betrachtung in 14 größere Fraktionen (D 1 – D 14) vereinigt werden. Wie in Tabelle 15 zu erkennen ist, waren lediglich die Fraktionen D 3 – D 7 aktiv, wobei D 5 mit 244,9 mg die größte Fraktion darstellte.

20.3.4 Gelfiltrationschromatographie (Fraktion D 5)

Fraktion D 5 wurde weiterführend durch Gelfiltrationschromatographie an Sephadex® LH-20, wie in Kapitel 13.4.3.2 dargestellt, fraktioniert. Von den erhaltenen sechs Fraktionen (E 1 – E 6) konnten lediglich zwei auf Aktivität überprüft werden: E 3 (84,74 mg) zeigte eine Induktion der Luciferase, wohingegen E 2 (120,11 mg) einen geringen reprimierenden Effekt auf die Expression des Reportergens zeigte. Die anderen Fraktionen lagen in für eine Testung nur unzureichender Menge vor.

Tabelle 16:

Kenngrößen der Fraktionen E 1 – E 6 (Gelfiltrationschromatographie, Fraktion D 5): Ausbeute, Luciferase-Aktivität ($c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8) und Zellvitalität (MTT-Test, $c = 50 \mu\text{g/ml}$, 25037 Klon 8).

Fraktion	Ausbeute [mg]	<i>fold change</i>	Vitalität [%]
E 1	18,84	/	/
E 2	120,11	0,70	82,31
E 3	84,74	3,46	87,88
E 4	13,80	/	/
E 5	4,67	/	/
E 6	3,36	/	/

20.3.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Fraktionen E 3 und G 6)

Eine weitere Aufreinigung zweier Extraktfraktionen fand mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie statt. Beide Trennungen erfolgten mit einem MeOH-Wasser-Gradienten an einer Eurospher 100-7 C18-Säule. Die exakten Trennbedingungen sind in Kapitel 13.4.2 aufgeführt.

Fraktion E 3

Aus der Sephadex-Fraktion E 3 wurden die HPLC-Fraktionen G 1 - G 9 gewonnen. Mit der Fraktion G 7 (6,38 mg) wurde eine Reinsubstanz erhalten, welche durch NMR-

Untersuchungen noch näher charakterisiert werden soll. Tabelle 17 stellt die Ausbeuten der einzelnen HPLC-Fractionen dar:

Tabelle 17:

Ausbeuten der einzelnen Fractionen der HPLC der Fraction E 3 der aktivitätsgeleiteten Fractionierung des methanolischen Extrakts A 3 der Pflanze *T. pandacaqui*.

Fraktion	Ausbeute [mg]
G 1	2,67
G 2	6,55
G 3	2,87
G 4	2,03
G 5	5,96
G 6	8,41
G 7	23,83
G 8	6,38
G 9	17,82

Fraktion G 6

Die präparative Trennung der Fraction G 6 resultierte in sechs neuen Fractionen (G 6-1 – G 6-6) von denen G 6-4 (3,58 mg) und G 6-5 (1,75 mg) zur NMR-Strukturanalyse ausgewählt wurden.

Tabelle 18:

Ausbeuten der einzelnen Fractionen der HPLC der Fraction G 6 der aktivitätsgeleiteten Fractionierung des methanolischen Extrakts A 3 der Pflanze *T. pandacaqui*.

Fraktion	Ausbeute [mg]
G 6-1	0,8
G 6-2	0,62
G 6-3	1,29
G 6-4	3,58
G 6-5	1,75
G 6-6	0,56

Aufgrund der geringen Mengen der HPLC-Fractionen war eine Testung im Luciferase-Reportergen-Assay vor Durchführung der Strukturaufklärung nicht möglich. Dies wird, insofern es die Restmengen erlauben, nach Abschluss der Strukturaufklärung, die zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen war, erfolgen.

20.4 Real-Time-RT-PCR: aktive *T.-pandacaqui*-Fraktionen

Zur Verifizierung der aus dem Luciferase-Reportergen-Assay erhaltenen Hinweise auf *APOE*-regulierende Aktivität der Fraktionen A 1, A 2, A 3, B 1, C 6, D 5 und E 3 wurde eine Genexpressionsanalyse mittels *Real-Time*-RT-PCR durchgeführt. Da sich in den Zelllinien U87-MG und 1321N1 bereits bei der Validierung des Assays Unterschiede in der Regulation des *APOE*-Gens bei einer Stimulation durch Dibutyryl-cAMP abzeichneten (siehe Kapitel 17.2), wurden zur Testung der aktiven Fraktionen beide Zelllinien verwendet.

Die Durchführung der *Real-Time*-RT-PCR fand analog zu der in Kapitel 10.3 beschriebenen Methode statt. Dabei wurden die Zellen in drei voneinander unabhängigen Experimenten jeweils für 24 h mit 50 mg/ml der Fraktionen stimuliert und die Regulation von *APOE* relativ zu *GAPDH* bestimmt.

Stimulation der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1

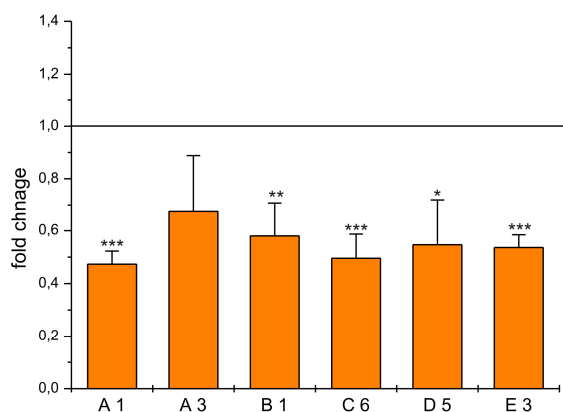


Abbildung 39:

Quantifizierung der *APOE*-mRNA:

***Real-Time*-RT-PCR der aktiven Fraktionen aus *T. pandacaqui* in 1321N1-Zellen**

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Inkubation (24 h, c = 50 µg/ml) der Zelllinie 1321N1 mit verschiedenen Extrakten und Fraktionen.

n = 3; ± SD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

(Student's t-Test)

Alle getesteten Fraktionen bewirkten eine Repression der *APOE*-Expression (Abbildung 39). Der stärkste Effekt war dabei für den DCM-Extrakt A 1 zu verzeichnen (FC = 0,47 ± 0,05; p < 0,001; Student's t-Test). Alle Messwerte sind Tabelle A8 im Anhang zu entnehmen.

Stimulation der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG

Zur Verifizierung der Daten aus den 1321N1-Zellen wurde auch eine Stimulation von U87-MG-Zellen durchgeführt. Neben den aktiven *T.-pandacaqui*-Fraktionen wurden die Zellen auch mit der im Luciferase-Reportergen-Assay als inaktiv erkannten Fraktion C 7 behandelt. Diese Fraktion diente somit als Negativ-Kontrolle.

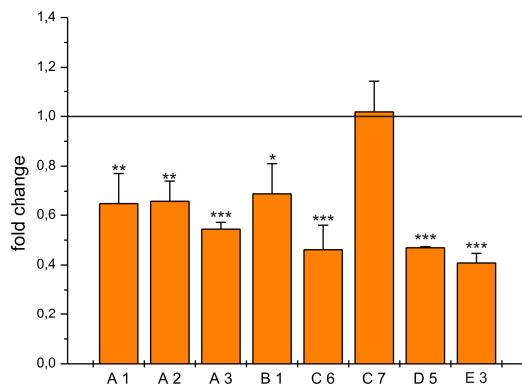


Abbildung 40:

Quantifizierung der *APOE*-mRNA:

***Real-Time*-RT-PCR der aktiven Fraktionen aus *T. pandacaqui* in U87-MG-Zellen**

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse nach Inkubation (24 h, c = 50 µg/ml) der Zelllinie U87-MG mit verschiedenen Extrakten und Fraktionen.

n = 3; ± SD

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Sowohl die drei durch ASE gewonnenen Extrakte A 1, A 2 und A 3, als auch die aktiven Fraktionen B 1, C 6, D 5 und E 3 bewirkten eine statistisch signifikante negative Regulation des *APOE*-Gens (Abbildung 40). Die im Reporter-gen-Assay inaktive Fraktion C 7 zeigte hingegen auch in diesem Assay keine Aktivität. Fraktion E 3 war am aktivsten: FC = 0,41 ± 0,04. Tabelle A9 im Anhang gibt einen Überblick über die Messwerte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die im Reporter-gen-Assay aktiven Fraktionen aus *T. pandacaqui* auch bei *Real-Time*-RT-PCR-Messungen *APOE*-mRNA-modulierende Aktivität zeigten. Bei allen Fraktionen war erneut die im Kapitel 16.3 thematisierte, gegenläufige Regulation des Reporter-gen-Assays im Vergleich zur Regulation des endogenen *APOE*-Gens erkennbar. Die Induktion des Reporter-gens zeigte sich in einer Repression des endogenen *APOE*-Gens der Zellen, wobei nur geringe Unterschiede zwischen den Zelllinien U87-MG und 1321N1 auftraten. Die Aktivität aller als aktiv detektierten Fraktionen wurde mittels *Real-Time*-RT-PCR bestätigt. Diese Ergebnisse bestätigten erneut die Aussagekraft des Luciferase-Reporter-gen-Assays. Trotz der inversen Regulation des Reporter-gens war es möglich, Substanzen und Extrakte mit *APOE*-modulierender Aktivität zu identifizieren.

21 Untersuchungen von aktiven Fraktionen aus *T. pandacaqui* in einem modifizierten Reporter-gen-Assay

Um den Einfluss verschiedener Extrakte, Fraktionen und Reinsubstanzen auf die Regulierung des *APOE*-Promotors in einem weiteren Testsystem untersuchen zu können, wurde ein Luciferase-Reporter-gen-Assay in transient transfizierten Zellen der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG entwickelt. Die Wahl fiel auf diese Zellen, da schon García *et al.* (1996) die Regulation der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors mittels transienter Transfektion dieser Zelllinie untersucht hatten. Als Reportervektor wurde das Plasmid pGL4.14-25037 verwendet, welches sowohl für die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors als auch für das Reporter-gen *Luciferase* (*Photinus pyralis*, Firefly) codiert. Der Vektor pRL-TK, der das *Luciferase*-Gen der gemeinen Seefeder (*Renilla reniformis*) enthält, wurde als Kontrollplasmid co-transfiziert. Die Durchführung des Assays fand, wie in Kapitel 11.2 beschrieben, statt. Nach 48 h Inkubation wurden die Aktivitäten beider Luciferasen bestimmt. Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Versuche zu je einem Triplet durchgeföhrt ($n = 3$).

Neben den drei durch ASE aus der Pflanze *T. pandacaqui* gewonnenen Extrakten A 1, A 2 und A 3, wurden auch die aktiven Fraktionen B 1, C 6, D 5 und E 3 im Luciferase-Assay mit transient transfizierten U87-MG Zellen gemessen. Weiterhin wurden die Zellen auch mit der bei der Aufarbeitung des methanolischen Extraktes als inaktiv bestimmten Fraktion C 7 inkubiert. Die Testkonzentration aller Extrakte betrug 50 µg/ml. Da García *et al.* (1996) von einer Induktion der Reporter-gen-Expression durch Dibutyryl-cAMP berichten, wurden damit zur Kontrolle des Assays Inkubationen in der Konzentration 1 mM durchgeföhrt. Ebenso wurde Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in der Konzentration 0,5 µM als Kontrollsubstanz verwendet, der von Cedazo-Mínguez *et al.* (2001a) eine *APOE*-reprimierende Aktivität in primären Ratten-Astrozyten bescheinigt wurde.

Weder eine Inkubation mit Dibutyryl-cAMP ($FC = 1,02 \pm 0,20$) noch mit der inaktiven Fraktion C 7 ($FC = 1,07 \pm 0,24$) führte zu einer statistisch signifikanten Veränderung der gemessenen Luciferase-Aktivität (Abbildung 41). Die als Repressor beschriebene Substanz PMA zeigte (mit einem $FC = 0,78 \pm 0,11$; $p < 0,05$; Student's t-Test) eine leichte Verminderung der Luciferase-Aktivität. Die durch ASE gewonnenen Extrakte A 1 ($FC = 0,49 \pm 0,19$; $p < 0,05$), A 2 ($FC = 0,76 \pm 0,05$; $p < 0,01$) und A 3 ($FC = 0,43 \pm 0,20$; $p < 0,01$) bewirkten alle eine, durch den Student's t-Test bestätigte, statistisch signifikante Repression der Reporter-gen-Expression. Dies war ebenso für die vier aktiven Fraktionen B 1

(FC = $0,31 \pm 0,05$; $p < 0,001$), C 6 (FC = $0,39 \pm 0,07$; $p < 0,001$), D 5 (FC = $0,26 \pm 0,10$; $p < 0,001$) und E 3 (FC = $0,36 \pm 0,07$; $p < 0,001$) zu verzeichnen.

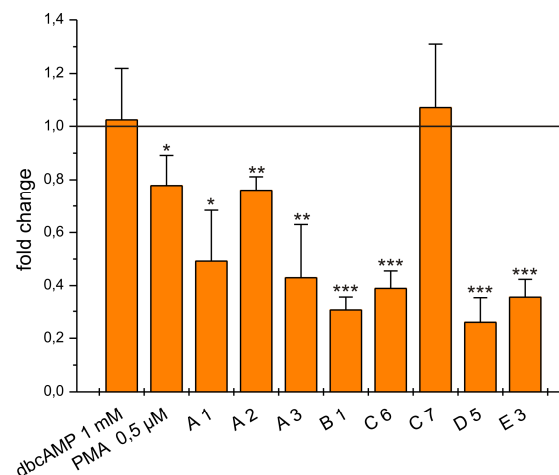


Abbildung 41: Untersuchungen von aktiven Fraktionen aus *T. pandacacui* in einem modifizierten Reporter-gen-Assay

Ergebnisse des transienten Luciferase-Reporter-gen-Assays (FC der Luciferase-Aktivität) in der Zelllinie U87-MG nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen Extrakten, Fraktionen ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) und Reinsubstanzen. $n = 3$; \pm SD

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Student's t-Test)

In Abbildung 41 ist deutlich zu erkennen, dass auch in diesem modifizierten Reporter-gen-Assay die schon als aktiv identifizierten Extrakte und Fraktionen erneut eine Aktivität an der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors zeigten. Im Gegensatz zu stabil transfizierten 1321N1-Zellen, die eine induzierte Reporter-gen-Expression und analog zu Inkubationen der nativen 1321N1- und U87-Zellen, die eine reprimierte Expression des endogenen *APOE*-Gens zeigten, konnte auch hier eine Repression der Expression des Reporter-gens *Luciferase* nach einer 48-stündigen Inkubation mit den aktiven Fraktionen aus *T. pandacacui* beobachtet werden. Somit konnte den Fraktionen eine eindeutige Aktivität zugeordnet werden.

Die durch Cedazo-Mínguez *et al.* (2001a) beschriebene Kontrollsubstanz PMA zeigte, wie in der Literatur beschrieben, eine Repression der Reporter-gen-Expression. Diese war zwar mit $\text{FC} = 0,78 \pm 0,11$ eher gering, jedoch entsprach die Richtung der Regulation den Literaturangaben. Die Durchführung eines Student's t-Tests ($p < 0,05$) konnte eine Signifikanz der Regulation bestätigen.

Auch im modifizierten Reporter-gen-Assay mit transient transfizierten U87-MG-Zellen war keine Modulation der Reporter-gen-Expression durch eine Inkubation mit Dibutyryl-cAMP zu beobachten. Nachdem weder in durchgeführten Reporter-gen-Assays oder mittels *Real-Time*-RT-PCR eine Beeinflussung der Expression durch Dibutyryl-cAMP gezeigt wurde, ist davon

auszugehen, dass in der hier verwendeten Zelllinie U87-MG keine Regulation am *APOE*-Promotor erfolgte.

Insgesamt kann dieser modifizierte Reporter-gen-Assay als ein valider Assay eingestuft werden, welcher den Einfluss verschiedener Substanzen und Extrakte auf die Regulation des endogenen *APOE*-Gens anhand der *Luciferase*-Expression widerspiegelt. Die bereits im Reporter-gen-Assay mit stabil transfizierten Zellen als aktiv erkannten Fraktionen zeigten hier erneut einen Einfluss auf die Regulation des Reportergens.

Diskussion

22 Etablierung eines Reporter-gen-Assays zur Identifizierung *APOE*-modulierender Verbindungen

22.1 Etablierung und Validierung eines Reporter-gen-Assays

Das erste im Zuge dieser Arbeit entwickelte Testsystem basierte auf der Entwicklung von Reporterzelllinien zur Identifizierung *APOE*-modulierender Verbindungen. Anhand der Modulation der Expression eines Reportergens sollten valide Vorhersagen bezüglich der Regulation des *APOE*-Gens durch Pflanzenextrakte und Reinsubstanzen getroffen werden können.

Die Verwendung von Reportergenen zur Expressionsanalyse, Promotor-Strukturanalyse oder Funktionsanalyse von SNPs in der Promotorregion ist eine weit verbreitete Methode in der pharmazeutischen und biomedizinischen Forschung. Insbesondere biolumineszente Reportergene wie die *Luciferase* des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* haben sich im Allgemeinen als ideal herausgestellt, da sie eine Reihe von Vorteilen bieten. Dazu gehören hohe Empfindlichkeit, großer dynamischer Messbereich, unmittelbare Messung sowie typischerweise fehlende endogene Aktivität in Zellen, die die Quantifizierung beeinträchtigen könnte (Simon *et al.*, 2008). Somit bot die Verwendung eines Luciferase-Reporter-gen-Assays eine optimale Möglichkeit zum Screening auf Substanzen, die in die Regulation des *APOE*-Gens via *APOE*-Promotor angreifen.

Es wurden Plasmide, die unterschiedliche *APOE*-Promotormutanten gekoppelt an das Reportergen *Luciferase* enthielten, durch Transfektion stabil in Zellen der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1 eingebracht. Die transfizierten Promotorvarianten unterschieden sich sowohl hinsichtlich ihrer Länge (-1000 bis +828 bzw. -1011 bis +400) als auch in den von Artiga *et al.* (1998a) beschriebenen SNPs an den Positionen -491 und -219 (vgl. Kapitel 15.3). Zur Validierung der erhaltenen Zelllinien (Mischkulturen verschiedener Klone und klonale Zelllinien) wurden diese auf Luciferase-Aktivität getestet und mittels der Substanz Dibutyryl-cAMP stimuliert. In allen 1321N1-Zelllinien war eine Repression der Luciferase-Aktivität nach einer 24-stündigen Inkubation zu beobachten. Eine Quantifizierung der *Luciferase*-mRNA in der klonalen Zelllinie 25037 Klon 8 zeigte, dass eine Verringerung der Luciferase-Aktivität nach einer Inkubation mit Dibutyryl-cAMP auch mit verringerter mRNA-Expression der *Luciferase* einherging (Kapitel 16.3).

Tabelle 19:

Übersicht über Effekte von Dibutyryl-cAMP in verschiedenen Zelllinien

verwendete Zellen	Methode	Regulation durch Dibutyryl-cAMP		Quellenangabe
primäre Astrozyten (Ratte)	Northern Blot (<i>APOE</i> -mRNA)	Induktion der <i>APOE</i> -Expression	↑	Cedazo-Mínguez <i>et al.</i> (2001a)
humane Astrozytomzellen (1321N1)	Reportergen-Analyse (<i>Luciferase</i>) nach stabiler Transfektion Promotorfragment: -1011/+400	Repression der Reportergen-Expression	↓	vorliegende Arbeit
humane Astrozytomzellen (1321N1)	<i>Real-Time</i> -RT-PCR (<i>APOE</i> -mRNA)	Induktion der <i>APOE</i> -Expression	↑	vorliegende Arbeit
humane Glioblastomzellen (U87-MG)	Reportergen-Analyse (<i>Luciferase</i>) nach transienter Transfektion Promotorfragment: -1011/+400	Induktion der Reportergen-Expression	↑	García <i>et al.</i> (1996)
humane Glioblastomzellen (U87-MG)	Reportergen-Analyse (<i>Luciferase</i>) nach stabiler Transfektion Promotorfragment: -1011/+400	Reporterzelllinien-abhängig keine Regulation bzw. eine Repression der Reportergen-Expression	→ ↓	vorliegende Arbeit
humane Glioblastomzellen (U87-MG)	Reportergen-Analyse (<i>Luciferase</i>) nach transienter Transfektion Promotorfragment: -1011/+400	fehlende Regulation der Reportergen-Expression	→	vorliegende Arbeit
humane Glioblastomzellen (U87-MG)	<i>Real-Time</i> -RT-PCR (<i>APOE</i> -mRNA)	fehlende Regulation der <i>APOE</i> -Expression	→	vorliegende Arbeit
humane Leberkarzinomzellen (HepG2)	Reportergen-Analyse (<i>Luciferase</i>) nach transienter Transfektion Promotorfragment: -1011/+400	fehlende Regulation der Reportergen-Expression	→	García <i>et al.</i> (1996)
humane Leberkarzinomzellen (HepG2)	Northern Blot (<i>APOE</i> -mRNA)	Repression der <i>APOE</i> -Expression	↓	Andreani-Mangeneý <i>et al.</i> (1996)
humane Leberkarzinomzellen (HepG2)	Reportergen-Analyse (SPAP) nach transienter Transfektion Promotorfragment: -614/+804	Repression der Reportergen-Expression	↓	Andreani-Mangeneý <i>et al.</i> (1996)
frisch isolierte Granulosazellen (Ratte)	Northern Blot (<i>APOE</i> -mRNA)	Induktion der <i>APOE</i> -Expression	↑	Wyne <i>et al.</i> (1989)

Die im Reporter-gen-Assay nach einer Stimulation mit Dibutyryl-cAMP erhaltenen Ergebnisse konnten nicht mit denen früherer Arbeiten in Einklang gebracht werden. Cedazo-Mínguez *et al.* (2001a) beschrieben eine Induktion der *APOE*-Expression in primären Rattenzellen (Astrozyten) und García *et al.* (1996) einen induktiven Effekt auf den *APOE*-Promotor in transient transfizierten Zellen der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG. Somit wäre zu erwarten gewesen, dass auch stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzellen eine induzierte Expression des Reportergens nach einer Stimulation mit Dibutyryl-cAMP zeigen. In allen 1321N1-Reporterzelllinien war jedoch eine Repression der Luciferase-Aktivität zu beobachten.

22.2 Untersuchung der inversen Regulation des Reportergens

Wie Tabelle 19 zu entnehmen ist, sind die Aussagen über *APOE*-regulierende Effekte von Dibutyryl-cAMP widersprüchlich. So beschrieben Cedazo-Mínguez *et al.* (2001a) in primären Astrozyten, García *et al.* (1996) in Glioblastomzellen und Wyne *et al.* (1989) in frisch isolierten Granulosazellen einen induzierenden Effekt, wohingegen Andreani-Mangeney *et al.* (1996) in Leberkarzinomzellen eine Repression der *APOE*-Expression beobachteten.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Reporter-gen-Assay mit stabil transfizierten Zellen wurde allgemein eine inverse Regulation des Reportergens festgestellt. Während nach Stimulation mit Dibutyryl-cAMP eine Repression der Luciferase-Aktivität und -Genexpression in stabil transfizierten 1321N1-Zellen zu beobachten war, konnte bei Behandlung mit dieser Verbindung in stabil transfizierten und untransfizierten 1321N1-Zellen eine Induktion der *APOE*-Expression nachgewiesen werden. Auch mit *APOE*-reprimierenden Extrakten und Fraktionen konnte eine inverse Regulation der *Luciferase* (mRNA, Aktivität) – hier nun Induktion – detektiert werden. Die Ursachen dieses inversen Zusammenhangs werden in der Folge diskutiert. Es sei jedoch bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit dieses Zusammenhangs der Reporter-gen-Assay in 1321N1-Zellen zur Identifizierung *APOE*-regulierender Verbindungen verwendet werden konnte. So wurde zur Entdeckung von Substanzen/Extrakten mit – therapeutisch relevantem – *APOE*-reprimierendem Potential nach Luciferase-Induktion gescreent.

Für die inverse Regulation von *Luciferase* und *APOE* kommen folgende Ursachen in Betracht:

1. Die inverse Regulation kann ein zellspezifisches Ereignis sein, welches lediglich bei den verwendeten 1321N1-Zellen auftritt.

2. Sowohl die Länge des klonierten Promotorfragments als auch die von Artiga *et al.* (1998a) beschriebene SNPs können einen Einfluss auf die Regulation des Reportergens nehmen.
3. Die inverse Regulation kann als Ergebnis der stabilen Transfektion auftreten.

Transfizierte Zelllinie

Um die Zelllinie als Ursache für die inverse Regulation ausschließen zu können, wurden die von García *et al.* (1996) verwendeten U87-MG-Zellen mit dem Plasmid pGL4.14-25037 stabil transfiziert. Aber auch die hierbei erhaltene klonale Zelllinie U87 25037 Klon 4 zeigte eine reprimierte Expression des Reportergens nach einer 24-stündigen Stimulation mit Dibutyryl-cAMP. Im Gegensatz dazu zeigte die Mischkultur-Zelllinie nach einer Stimulation U87 MK 25037 keinerlei Veränderungen in der Luciferase-Aktivität. Da auch in dieser Versuchsreihe keine Induktion beobachtet wurde, ist die verwendete Zelllinie als Einflussfaktor auszuschließen.

Promotorfragment

Die Länge des Promotorfragments als Einflussfaktor auf die gegenläufige Regulation von Reportergen und authentischem *APOE* konnte anhand der Transfektion zweier Reportervektoren untersucht werden, die für unterschiedlich lange Fragmente des *APOE*-Promotors kodieren. Sowohl die stabile Zelllinie mit dem Vektor pGL4.14-25027, der das Promotorfragment -1000 bis +828 enthält, als auch die Zelllinie des Vektors pGL4.14-25037 mit der 5'-regulatorische Region (-1011 bis +400) zeigten eine verminderte Luciferase-Aktivität nach einer Stimulation mit Dibutyryl-cAMP. Somit kann die Länge des klonierten Promotorfragments als Einflussfaktor auf die Regulation des Reportergens ausgeschlossen werden.

Um einen Einfluss der für die 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors beschriebenen SNPs (Artiga *et al.*, 1998a) ausschließen zu können, wurden Promotormutanten, die sich in den SNPs der Positionen -491 und -219 unterscheiden, kloniert und stabil in humane 1321N1-Zellen transfiziert. Folgende SNP-Kombinationen wurden erhalten (Kapitel 15.3):

Tabelle 20:
Übersicht der SNPs in der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors der klonierten Plasmide

Plasmid-Nr.	-491	-427	-219	+113
pGL4.14-25037	T	T	G	G
pGL4.14-25038	A	T	G	G
pGL4.14-25039	T	T	T	G
pGL4.14-25040	A	T	T	G

Es wurde ersichtlich, dass die SNPs der Positionen -491 und -219 keinen Einfluss auf die inverse Regulation des Reportergens nehmen, denn bei allen erhaltenen stabilen Zelllinien der Plasmide pGL4.14-25037, pGL4.14-25038 und pGL4.14-25039 wurde eine Repression der *Luciferase*-Expression nach Stimulation mit Dibutyryl-cAMP beobachtet. Da bei der Transfektion des Plasmids pGL4.14-25040 keine *Luciferase*-exprimierende Zelllinie generiert werden konnte, war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, den Einfluss der SNP-Kombination -491A / -219T auf die Regulation des Reportergens zu untersuchen. Ausgehend vom Plasmid pGL4.14-25037 konnten lediglich die einzelnen Punktmutationen der Positionen -491 und -219 getestet werden. Es fand jedoch weder durch die Punktmutation -491T zu A noch durch die Punktmutation -219G zu T eine Beeinflussung der *Luciferase*-Expression statt. Da von García *et al.* (1996) ein Plasmid entsprechend der SNP-Kombination von pGL4.14-25040 verwendet wurde, und hiermit eine Induktion der Reportergen-Expression nach einer Stimulation mit Dibutyryl-cAMP in transient transfizierten Zellen beobachtet werden konnte, ist ein Einfluss der SNPs auf die inverse Genregulation im Reportergen-Assay mit stabil transfizierten Zellen nicht vollkommen auszuschließen, erscheint aber aufgrund der beschriebenen eigenen Beobachtungen unwahrscheinlich.

Im Rahmen der Charakterisierung der 5'-regulatorischen Region des *APOE*-Promotors der 1321N1-Zellen konnten für diese Zelllinie die Haplotypen 491T, -427T, -219G, +113G und 491A, -427T, -219T, +113G bestimmt werden. Stimulationsversuche mit Dibutyryl-cAMP und anschließende *Real-Time*-RT-PCR zeigten, dass eine 24-stündige Inkubation in einer induzierten *APOE*-mRNA-Expression resultierte. Daran ist zu erkennen, dass auch bei einem Vorliegen des Haplotypen 491T, -427T, -219G, +113G in der Zelle selbst eine Induktion durch Dibutyryl-cAMP hervorgerufen werden kann. Somit ist es wahrscheinlich, dass die gegenläufige Regulation des Reportergens in stabil transfizierten Zellen nicht auf die unterschiedlichen SNPs der Promotorregion zurückzuführen ist.

Stabile Transfektion vs. transiente Transfektion

Im Zuge der Entwicklung des modifizierten Reportergen-Assays fanden transiente Transfektionen von U87-MG-Zellen statt (siehe Kapitel 21). Eine Stimulation der mit dem Plasmid pGL4.14-25037 transient transfizierten Zellen mit aktiven Fraktionen des methanolischen Extrakts der Pflanze *T. pandacacui* zeigte, dass in diesem Assay die Regulation der Expression des Reportergens mit der Regulation des authentischen *APOE*-Gens einherging. *Real-Time*-RT-PCR-Messungen der *APOE*-mRNA nach einer Stimulation von nativen U87-MG-Zellen mit den aktiven Fraktionen wiesen, analog zur Aktivität der *Luciferase* im modifizierten Reportergen-Assay, eine reprimierte Expression auf. Somit

scheint die inverse Regulation ein Ergebnis der stabilen Transfektion zu sein, deren Ursache im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht weiter aufgeklärt wurde.

Weiterhin konnten transiente Transfektionen die Theorie untermauern, dass die SNPs in der 5'-regulatorischen Region keinen Einfluss auf die gegenläufige Regulation des Reportergens nehmen. Da sowohl zur stabilen als auch zur transienten Transfektion der U87-MG-Zellen das Plasmid pGL4.14-25037 verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass bei transienter Transfektion auch ein Plasmid mit dem Haplotyp 491T, -427T, -219G, +113G, zur Identifizierung von *APOE*-modulierenden Substanzen und Extrakten herangezogen werden kann. Denn die durch transiente Transfektion erhaltenen Ergebnisse ließen eine Vorhersage auf die Regulation des authentischen *APOEs* zu, da keine inverse Regulation zwischen Reportergen und *APOE*-Gen auftrat.

Somit bietet der hier etablierte Reportergen-Assay mit stabil transfizierten Zellen trotz der inversen Regulation des Reportergens *Luciferase* die Möglichkeit *APOE*-modulierende Substanzen zu identifizieren. Weiterführende Untersuchungen (modifizierter Reportergen-Assay basierend auf transienter Transfektion der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG und Genexpressionsanalysen mittels *Real-Time*-RT-PCR) der in diesem Assay als aktiv identifizierten Fraktionen der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des methanolischen Extrakts der Pflanze *T. pandacaqui* zeigten, dass die Aktivität auch in weiteren Assays wieder zu finden war.

22.3 Modifizierter Reportergen-Assay

Da durch stabile Transfektion keine Reporterzelllinie erhalten werden konnte, deren Reportergen-Regulation die des authentischen *APOEs* widerspiegelt, wurde ein Reportergen-Assay entwickelt, der auf transienter Transfektion der Zellen basierte. Der hier etablierte modifizierte Reportergen-Assay wurde auf dem *Dual-GloTM Luciferase Assay System* von Promega aufgebaut. Neben dem Reportervektor, der sowohl für den zu untersuchenden *APOE*-Promotor als auch für die *Luciferase* (*Firefly*) kodierte, wurde ein Kontrollplasmid co-transfiziert, das das *Luciferase*-Gen der gemeinen Seefeder *Renilla reniformis* trug.

Das *Dual-GloTM Luciferase Assay System* von Promega bietet die Möglichkeit, die Aktivitäten der beiden Luciferasen hintereinander in einem Reaktionsgefäß zu messen, da unterschiedliche Substrate und Reaktionsbedingungen zur Bildung von Lumineszenz nötig sind. Da bei der Berechnung der *fold changes* (Verhältnis der Luciferase-Aktivität zwischen dem Stimulations- und dem Kontrollexperiment) eine Normalisierung auf den konstitutiv

exprimierten Kontrollvektor stattfindet, ist dieser Assay weniger anfällig gegenüber Störungen im Vergleich zur alleinigen transienten Transfektion des Reporterplasmids. Insbesondere, wenn eine Repression der Aktivität der *Firefly*-Luciferase beobachtet wird, hilft die Co-Transfektion Fehlerquellen wie Zelltod, Inhibition von Zellwachstum und unterschiedliche Transfektionseffizienzen in den einzelnen *wells* als Fehlerquelle auszuschließen. Auf diese Weise ist es möglich, genetische Repression von Zytotoxizität abzugrenzen (Hawkins *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Glioblastomzellen der Zelllinie U87-MG mit dem Reportervektor pGL4.14-25037, welcher für die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors sowie die *Firefly*-Luciferase kodiert, und dem *Renilla*-Kontrollplasmid pRL-TK transient transfiziert, um Substanzen und Extrakte auf *APOE*-modulierende Eigenschaften zu testen. Die bereits durch *Real-Time*-RT-PCR-Messungen und im Reporter-Gen-Assay mit stabil transfizierten Zellen als aktiv identifizierten Extrakte und Extraktfraktionen aus *T. pandacacui* zeigten auch in diesem Assay *APOE*-modulierende Eigenschaften.

Zur Validierung des Assays fand eine Stimulation der transfizierten Zellen mit den Substanzen PMA und Dibutyryl-cAMP sowie der inaktiven Fraktion C 7 der aktivitätsgeleiteten Extraktfraktionierung statt. C 7 führte auch im modifizierten Reporter-Gen-Assay zu keiner Veränderung der Expression der *Luciferase*. Wie bei Cedazo-Mínguez *et al.* (2001a) beschrieben, konnte in diesem Assay eine, wenn auch mit einer $FC = 0,78 \pm 0,11$ ($p < 0,05$; Student's t-Test) nur geringe, reprimierte Expression des Reportergens durch eine Stimulation mit PMA hervorgerufen werden. Die Stimulation transfizierter U87-MG-Zellen mit Dibutyryl-cAMP über 24 h Stunden führte zu keiner Veränderung der Expression des Reportergens. Obwohl García *et al.* (1996) eine Induktion der *Luciferase*-Expression in U87-MG-Zellen nach transienter Transfektion eines Reporterplasmids, welches auch für die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors kodiert, beschrieben, konnte dies im eigenen Versuch nicht reproduziert werden. Auch eine Stimulation nativer U87-MG-Zellen mit Dibutyryl-cAMP und anschließender Quantifizierung der *APOE*-mRNA zeigte, dass es zu keiner Genregulation kam. Die Substanz Dibutyryl-cAMP selbst konnte als Fehlerquelle ausgeschlossen werden, da 1321N1-Zellen eine Induktion der *APOE*-Expression nach einer 24-stündigen Stimulation anhand von *Real-Time*-RT-PCR-Messungen zeigten.

Da mittels zwei unterschiedlicher Methoden der Substanz Dibutyryl-cAMP keine *APOE*-modulierenden Eigenschaften in humanen U87-MG-Zellen zugewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass in der vorliegenden Zelllinie Dibutyryl-cAMP keinen Einfluss auf die Regulation des *APOE*-Gens hat.

Unterschiede hinsichtlich der *APOE*-modulierenden Eigenschaften von Dibutyl-*cAMP* innerhalb einer Zelllinie sind auch in der Literatur zu finden (Tabelle 19). García *et al.* (1996) führten transiente Transfektionen mit der humanen Leberkarzinom-Zelllinie HepG2 durch. Dazu wurde die 5'-regulatorische Region des *APOE*-Promotors in ein *Luciferase*-Reporterplasmid kloniert. Als Kontrollplasmid diente ein β -Galactosidase-kodierendes Plasmid, welches co-transfiziert wurde. Eine Stimulation der transfizierten Zellen mit Dibutyl-*cAMP* führte zu keinerlei Regulation der Expression des Reportergens. Andreani-Mangeney *et al.* (1996) hingegen konnten eine Repression der Expression des Reportergens, welches für die Region -614 bis +804 des *APOE*-Gens kodierte, um 50 % nach einer Stimulation mit Dibutyl-*cAMP* beobachten. Auch eine Genexpressionsanalyse zeigte eine reprimierte *APOE*-mRNA-Expression in HepG2-Zellen.

Da auch in der Literatur Unterschiede im Verhalten einer Zelllinie zu finden sind, ist es durchaus möglich, dass es sich im Fall der Zelllinie U87-MG ebenso verhält. Dafür spricht, dass bei der hier verwendeten U87-MG-Zelllinie weder im modifizierten Reporter-Gen-Assay noch bei der Genexpressionsanalyse mittels *Real-Time*-RT-PCR eine Stimulation mit Dibutyl-*cAMP* eine veränderte Expression des Reportergens bzw. des *APOE* herbeiführen konnte. Somit kann trotz der widersprüchlichen Ergebnisse nach einer Stimulation mit Dibutyl-*cAMP* der hier etablierte modifizierte Reporter-Gen-Assay als valide angesehen werden.

Insgesamt erwies sich die Durchführung des Reporter-Gen-Assays in stabil transfizierten Zellen hinsichtlich Kosten, Zeitaufwand und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als wesentlich vorteilhafter, daher wurden trotz inverser Regulation von *Luciferase*-Aktivität bzw. *Luciferase*-Expression und Regulation des nativen *APOE*-Gens klonale stabil transfizierte 1321N1-Astrozytomzelllinien zum Screening nach *APOE*-modulierenden Substanzen und Extrakten verwendet.

23 Screening zur Identifizierung *APOE*-modulierender Verbindungen

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 39 Reinsubstanzen und 85 Pflanzenextrakte verschiedener Herkunft auf *APOE*-modulierende Eigenschaften in einem Reporter-Gen-Assay mit stabil transfizierten 1321N1-Astrozytomzellen untersucht (siehe Kapitel 18). Um den

Einfluss der als aktiv erkannten Substanzen und Extrakte auf die Regulation des authentischen *APOE*-Gens zu bestätigen, wurden *Real-Time*-RT-PCR-Messungen durchgeführt.

Reinsubstanzen

Bei der Testung der 39 Reinsubstanzen aus dem medizinisch-chemischen Labor von Prof. Dr. Jochen Lehmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) im Luciferase-Reportergen-Assay waren fünf Substanzen auffällig: LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28 und LEYS 517 führten zu einer Induktion, Atorvastatin hingegen zu einer Repression der Luciferase-Aktivität. Bei allen Reinsubstanzen war eine konzentrationsabhängige Regulation des Reportergens nach 24-stündiger Inkubation zu sehen.

Eine Genexpressionsanalyse mittels *Real-Time*-RT-PCR bestätigte die *APOE*-modulierenden Eigenschaften des Atorvastatin. Gemäß der bereits thematisierten inversen Regulation des Reportergens *Luciferase*, konnte hier eine statistisch signifikant verstärkte *APOE*-mRNA-Expression ($FC = 1,69 \pm 0,25$; $p < 0,01$; Student's t-Test) in der untransfizierten Astrozytomzelllinie 1321N1 bei einer Testkonzentration von 50 μ M beobachtet werden.

Die größte Induktion im Luciferase-Reportergen-Assay konnte durch das Flurbiprofen-Analogon LEKL 4 ($c = 50$ mM, $FC = 2,44 \pm 0,13$; $p < 0,001$; Student's t-Test) beobachtet werden. Dennoch konnten *Real-Time*-RT-PCR-Messungen der *APOE*-mRNA diese Ergebnisse nicht bestätigen. Zwar war eine Tendenz im Sinne einer Repression der *APOE*-Expression nach Behandlung mit LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28 und LEYS 517 zu erkennen, diese Regulationen im Bereich von $FC = 0,76 \pm 0,25$ (LEKL 4) bis $FC = 0,91 \pm 0,32$ (LEYS 517) waren jedoch statistisch nicht signifikant.

TCM-Drogen

Die Testung von 22 Pflanzenextrakten aus 11 TCM-Drogen im Reportergen-Assay (stabil transfizierte 1321N1-Zellen) führte zur Identifikation von zwei Extrakten mit *APOE*-modulierenden Eigenschaften. Beide Extrakte entstammten der getrockneten Wurzel Droge der Pflanze *Scutellaria baicalensis* Georgi. Sowohl der wässrige als auch der methanolische Extrakt (TCM 9 W und TCM 9 M) zeigte eine Induktion der Expression des Reportergens *Luciferase*.

Eine Untersuchung der beiden Extrakte auf Modulation der *APOE*-Regulation auf RNA-Ebene anhand von *Real-Time*-RT-PCR-Messungen führte jedoch nicht zu einer statistisch signifikanten Veränderung der *APOE*-Expression.

Insgesamt ist aufgrund der Ergebnisse der Behandlung der Zellen mit den oben genannten TCM-Extrakten und Reinsubstanzen (LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28 und LEYS 517) festzustellen, dass eine aufgrund einer bis 2,5fachen Induktion der Luciferase-Aktivität im Reporter-gen-Assay zu vermutende negative Regulation des *APOE*-Gens in untransfizierten Zellen nicht in statistisch signifikantem Ausmaß zu beobachten ist.

Pflanzenextrakte der Vanuatu-Wildsammlung

Im Jahr 2006 wurde im Inselstaat Vanuatu Drogenausgangsmaterial von insgesamt 18 Pflanzen mit potentiell immunomodulatorischen Eigenschaften gesammelt (Bradacs, 2008a). Die daraus gewonnenen 63 Extrakte wurden im Reporter-gen-Assay (stabil transfizierte 1321N1-Zellen) getestet, von welchen fünf Extrakte zu einer statistisch signifikanten Repression der Luciferase-Aktivität führten (Kapitel 18.3). Der am stärksten ausgeprägte Effekt war bei einer Inkubation mit den Extrakten der Pflanze *Tabernaemontana pandacaqui* zu beobachten, deren Drogenausgangsmaterial im Zuge der Wildsammlung im Inselstaat Vanuatu an zwei verschiedenen Standorten gesammelt wurde: Lungharigi, Loh, Torres Islands (I) und Lélé, Ambrym (II). Neben vier weiteren Extrakten der Pflanze war der Dichlormethanextrakt des zweiten Standorts (II) besonders wirksam. Eine derart starke Induktion der Luciferase-Aktivität ($FC = 4,09 \pm 0,26$; $p < 0,001$; Student's t-Test) konnte für keine Reinsubstanz und keinen anderen Extrakt beobachtet werden. Aufgrund des deutlich geringeren Chlorophyll-Gehaltes wurde jedoch der etwas schwächer wirkende methanolische ASE-Extrakt ($FC = 3,57 \pm 0,33$; $p < 0,001$; Student's t-Test) für eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung mit dem Ziel einer Identifizierung wirkbestimmender Strukturen verwendet.

24 Aktive Verbindungen aus *T. pandacaqui*

24.1 Testung der Alkaloid-Fraktion auf *APOE*-mRNA-modulierende Aktivitäten

Wie bereits erwähnt, fokussierten alle bisherigen Untersuchungen der Pflanzenextrakte von *T. pandacaqui* auf die Alkaloid-Fraktion. Taesotikul *et al.* (1989, 1990, 1998a, 1998b und 2003) konnten dieser Fraktion unter anderem ZNS-dämpfende sowie anti-inflammatorische, antipyretische und antinozizeptive Eigenschaften zuordnen.

Interessanterweise stellte sich die Alkaloid-Fraktion im Bezug auf die *APOE*-Regulation in *Real-Time*-RT-PCR- und Luciferase-Messungen als inaktiv heraus. Eine Testung des

alkaloidhaltigen und –freien Extrakts A 1 erbrachte keine abweichenden Resultate, sodass die Alkaloide als nicht wirkbestimmend angesehen werden können.

24.2 Aktive Fraktionen

Zur Isolierung aktiver Extraktkomponenten wurde der methanolische Extrakt von *T. pandacaqui* aktivitätsgeleitet fraktioniert. Eine Testung auf *APOE*-modulierende Eigenschaften der erhaltenen Fraktionen wurde nach jedem Extraktionsschritt im Luciferase-Reporter-Gen-Assay mit stabil transfizierten 1321N1-Zellen durchgeführt.

Die durch den Reporter-Gen-Assay getroffenen Vorhersagen zur *APOE*-Regulation der einzelnen Fraktionen konnten durch Genexpressionsanalysen in 1321N1- und U87-MG-Zellen mittels *Real-Time*-RT-PCR bestätigt werden. Es wurden stets negative Regulationen von *APOE* beobachtet. Eine Inkubation transient transfizierter U87-Zellen mit aktiven Fraktionen führte ebenfalls zu einer reprimierten Luciferase-Aktivität.

Die letzte als aktiv getestete Fraktion E 3 wurde im Anschluss an die Testung mittels HPLC gereinigt. Es konnten die drei Reinsubstanzen G 7, G 6-4 und G 6-5 isoliert werden. Da diese Substanzen nur in sehr geringen Mengen vorlagen, musste die Strukturanalyse (NMR) einer Testung im Reporter-Gen-Assay vorangestellt werden. Diese dauerte zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch an. Da alle drei Reinsubstanzen aus einer aktiven Fraktion isoliert wurden, wäre es denkbar, dass einer Substanz *APOE*-modulierende Eigenschaften zugewiesen werden können.

25 Ausblick: *APOE* als therapeutischer Angriffspunkt

Die Entwicklung einer Alzheimer-Demenz kann verschiedenen genetischen und umweltbedingten Faktoren zugeordnet werden. Unter anderem konnten die Mutationen des *APP*-Gens und der *PSEN*-Gene als Ursache für die familiäre Form der AD identifiziert werden. Jedoch sind weniger als 10 % aller AD-Fälle diesem Typ der Erkrankung zuzuordnen. Die weitaus häufiger auftretende Form ist die sporadische Form der Alzheimer-Demenz. Neben dem Alter ist hier das *APOEε4*-Allel als wichtigster genetischer Risikofaktor für den Ausbruch der Krankheit beschrieben (Marques und Crutcher, 2003).

Das ApoE-Protein kann mit vielen Merkmalen der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören Lipid-Dysfunktion, Verlust synaptischer Plastizität, cholinerge Dysfunktion, A β -Ablagerungen und die Bildung neurofibrillärer Bündel. Das Vorliegen eines *APOE ϵ 4*-Allels verschlechtert die Symptomatik, wohingegen die anderen Isoformen als protektiv gelten (Cedazo-Mínguez, 2007). Vor diesem Hintergrund bietet das ApoE-Protein einen neuen, möglicherweise zentralen Angriffspunkt zur Therapie einer Alzheimer-Demenz. Da dem ApoE-Protein viele verschiedene Funktionen und auch Isoform-abhängige Effekte zugeschrieben werden können, ist ApoE kein typisches therapeutisches Ziel, da es je nach Isoform sowohl positive als auch schädigende Effekte ausüben kann. Ziel einer auf ApoE-gerichteten Therapie könnte es sein, zum einen die protektiven Effekte von ApoE3 und ApoE2 zu verstärken und zum anderen die schädigenden Effekte von ApoE4 zu verringern. Eine Erhöhung des ApoE-Spiegels bei Alzheimer-Patienten würde zur Verbesserung der Lipidhomöostase führen und somit die Synaptogenese und die Regeneration begünstigen. Bedenkt man aber die schädigenden Effekte, die die Isoform ApoE4 mit sich bringt, ist eine Erhöhung des ApoE-Spiegels lediglich für Patienten von Vorteil, die die Allele *APOE ϵ 2* oder *APOE ϵ 3* besitzen (Cedazo-Mínguez, 2007).

Des Weiteren gibt es mehrere denkbare therapeutische Angriffspunkte auf Proteinebene. Es wäre z.B. der Einsatz von ApoE-mimetischen Verbindungen denkbar, die die Funktionen des intakten Holoproteins übernehmen und die Blut-Hirn-Schranke passieren können. Basierend auf der Vorstellung, dass ApoE als Chaperon fungiert und so A β -Ablagerungen fördert, wäre es möglich, Substanzen einzusetzen, die die ApoE/A β -Interaktion unterbinden (Cedazo-Mínguez, 2007). Eine weitere therapeutische Strategie wäre der Einsatz von Molekülen, die in der Lage sind, die Domäneninteraktion des ApoE4 zu blockieren. Diese so genannten Struktur-Korrektoren würden somit das ApoE4 in ein ApoE3-ähnliches Protein überführen, und dadurch die Lipid-Bindungseigenschaften verbessern sowie die erhöhte ApoE4-Proteinspaltung auf das Ausmaß von ApoE3 reduzieren. Theoretisch würden dadurch die negativen Eigenschaften des ApoE4 unterbunden und protektive Eigenschaften verstärkt (Mahley *et al.*, 2006). Ein weiterer Angriffspunkt wäre die Verwendung von Protease-Inhibitoren, die die Entstehung schädlicher bzw. neurotoxischer Fragmente des ApoE4 verhindern sollen.

Lahiri (2004) berichtete, dass neben der Protein-Isoform auch die transkriptionale Aktivität des *APOE*-Gens einen Risikofaktor darstellt. Es wurde festgestellt, dass der *APOE*-mRNA-Spiegel im Gehirn bei Alzheimer-Patienten signifikant höher war als bei der Kontrollgruppe. Insbesondere in Kombination mit dem *APOE ϵ 4*-Allel könnten erhöhte mRNA-Spiegel eine

Rolle bei der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz spielen. Somit bieten sich auch regulatorische Sequenzelemente des Promotors als therapeutischen Angriffspunkt an, um die Expression des *APOE*-Gens zu kontrollieren.

Das Problem das sich jedoch bei einer Alzheimer-Therapie auf Expressionsebene stellt, ist, dass hier ebenfalls eine Isoform-abhängige Therapie stattfinden muss. Während sich eine Erhöhung des Proteinlevels des ApoE3 als protektiv erweisen könnte, wäre es im Falle des ApoE4 eher schädlich, da sich die negativen Effekte des Proteins, wie z.B. die vermehrte Bildung neurotoxischer Fragmente durch erhöhte Proteolyseanfälligkeit potenzieren würden. Somit müsste beim Vorkommen des *APOEε4*-Allels das Hauptaugenmerk darauf liegen, die schädigenden Effekte von ApoE4 zu verringern. Erschwerend kommt hinzu, dass die Mehrheit der AD-Patienten nicht homozygot für das *APOEε4*-Allel ist. So stellt sich die Frage, welche Therapie für heterozygote *APOEε3/APOEε4*-Patienten geeignet wäre, und wie sie auf eine Therapie, die den ApoE-Spiegel beeinflusst, reagieren.

In jedem Fall scheint es jedoch notwendig zu sein, im Vorfeld der Therapie eine Genotypisierung des Patienten durchzuführen, da sich die Protein-Isoformen hinsichtlich ihrer Eigenschaften unterscheiden. Eine „*APOE*-Therapie“ ist nur dann sinnvoll, wenn sie individuell auf den jeweiligen Patienten fokussiert. Dies könnte aufgrund der Entwicklungen auf dem Gebiet der Pharmakogenetik bereits in nicht allzu ferner Zukunft möglich sein.

Zusammenfassung

Für das Auftreten der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit ist die genetische Variante *APOEε4* des *APOE*-Gens als Risikofaktor bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *In-Vitro*-Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die die Expression der *APOE*-mRNA modulieren und somit potenziell neuroprotektiv wirken können.

Dafür wurde zunächst die Promotorregion des *APOE*-Gens isoliert und vor ein *Luciferase*-Reportergen kloniert. Dieser Reportervektor wurde in Zellen der humanen Astrozytomzelllinie 1321N1 sowie der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG stabil eingebracht. Die erhaltenen Reporterzelllinien wurden mit chemisch definierten Substanzen oder Pflanzenextrakten inkubiert, um anhand der ermittelten Luciferase-Aktivität Vorhersagen bezüglich *APOE*-modulierender Eigenschaften der untersuchten Substanzen und Extrakte treffen zu können. Allerdings wurde ein inverser Zusammenhang zwischen der Regulation von Luciferase-Aktivität und *Luciferase*-Genexpression einerseits und der Regulation des nativen *APOE*-Gens andererseits festgestellt. Die Ursachen hierfür konnten nicht abschließend geklärt werden. Der Effekt trat unabhängig von der *APOE*-Promotor-Länge und Basenaustauschen (SNPs) in der Promotorregion und nicht Zelllinien-spezifisch auf. Dennoch war der inverse Zusammenhang reproduzierbar, so dass der Luciferase-Reportergen-Assay in stabil transfizierten 1321N1-Zellen für ein initiales Screening nach *APOE*-modulierenden Verbindungen und Extrakten genutzt wurde.

Insgesamt wurden 39 Reinsubstanzen und 85 Extrakte aus 29 Pflanzen in dem beschriebenen Reporter-gen-Assay getestet. Davon zeigten fünf Reinsubstanzen und zehn Pflanzenextrakte eine *APOE*-modulierende Aktivität. Die am stärksten ausgeprägte Regulation der *Luciferase* im Reporter-gen-Assay war nach einer Kultivierung der Zellen mit Extrakten der Pflanze *Tabernaemontana pandacqui* LAM. (Apocynaceae) zu beobachten. Die Alkaloide des Dichlormethanextraktes konnten als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe ausgeschlossen werden. Der methanolische Extrakt wurde zu einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung herangezogen, in deren Verlauf aus einer aktiven Fraktion drei Unterfraktionen einer Strukturaufklärung zugeführt werden konnten.

Parallel wurde ein modifizierter Luciferase-Reportergen-Assay in transient transfizierten Zellen der humanen Glioblastomzelllinie U87-MG etabliert. Hier zeigte sich eine korrelierte Regulation von Luciferase-Aktivität und *APOE*-Genexpression (Quantifizierung der mRNA

durch *Real-Time*-RT-PCR) bei Untersuchung der zuvor im Reporter-gen-Assay mit stabil transfizierten 1321N1-Zellen als aktiv identifizierten Extrakte und Fraktionen aus *T. pandacaqui*.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierten Reporter-gen-Assays sind geeignet, in einem Hochdurchsatz-Screening, das mit der Methode der *Real-Time*-RT-PCR nur schwer zu realisieren ist, nach Substanzen zu suchen, die eine pathologisch erhöhte *APOE*-Expression im zentralen Nervensystem positiv beeinflussen könnten. Im Zuge der weiteren Forschung auf dem Gebiet der Alzheimer-Demenz wird sich zeigen, ob insbesondere für Individuen mit mindestens einem *APOEε4*-Allel die Herabsetzung der *APOE*-Expression zur Verminderung ApoE4-vermittelter Neurotoxizität ein interessanter Ansatz zur Prophylaxe oder Therapie ist.

Summary

The genetic variant *APOE* ϵ 4 of the *APOE* gene is a risk factor for sporadic late-onset Alzheimer's disease. The main purpose of the thesis here presented, was the establishment of an *in vitro* assay that allows the identification of *APOE* mRNA modulating – and therefore potential neuroprotective – substances.

In the first place, the promoter region of the *APOE* gene was isolated and cloned in front of a *luciferase* reporter gene. This reporter vector was stably transfected into human astrocytoma 1321N1 cells and human glioblastoma U87-MG cells, respectively. The obtained reporter cell lines were incubated with chemically defined compounds or plant extracts to predict their *APOE* modulating properties by measuring luciferase activity. An inverse correlation between the regulation of the native *APOE* gene on the one hand and regulation of luciferase activity and *luciferase* gene expression on the other hand was observed. This effect occurred independently from the length of the promoter fragment and base exchanges (SNPs) in the promoter region and was not cell line-specific. Nevertheless, the inverse correlation was reproducible and therefore the reporter gene assay in stable transfected 1321N1 cells was used for an initial screening for *APOE*-modulating substances and extracts. A total of 29 chemically-defined compounds and 85 extracts from 25 plants were tested in the described reporter gene assay, of which nine substances and ten plant extracts showed *APOE* modulatory properties. The most pronounced effect was observed after cultivating the cells in the presence of plant extracts derived from *Tabernaemontana pandacaqui* LAM. (Apocynaceae). The crude alkaloid fraction of a dichloromethane extract lacked activity, suggesting the absence of the active principle in this fraction. In contrast, activity guided fractionation was conducted with a methanol extract, resulting in the identification of three subfractions that were subjected to structure elucidation.

Furthermore, a modified reporter gene assay was established in transiently transfected human glioblastoma U87-MG cells. Here, a correlated regulation of luciferase activity and *APOE* gene expression (quantification of mRNA by real-time RT-PCR) was observed by incubation with active extracts and fractions of *T. pandacaqui*.

The established reporter gene assays are suitable for high-throughput screening – which is hardly practicable by means of real-time-RT-PCR – to identify substances that might be able to influence pathological elevated ApoE levels positively in the central nervous system.

Further research is needed to clarify, if – especially for individuals carrying at least one *APOE* ϵ 4 allele – the reduction of *APOE* expression in order to minimize ApoE4-mediated neurotoxicity might be an interesting approach in the prophylaxis or therapy.

Literaturverzeichnis

- Andreani-Mangeney M, Vandenbrouck Y, Janvier B, Girlich D und Bereziat G (1996):** Transcriptional regulation of apolipoprotein E expression by cyclic AMP. *FEBS Letters* **397**:155-58.
- Aguila-Santos G, Santos AC und Joson LM (1963):** Alkaloids of the *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. Isolation of Coronaridine. *Anales de la Real Academia de Farmacia* **29**:391-94.
- Ahrendt T (1999):** Das Wichtigste 2 – Die neurobiologischen Grundlagen der Alzheimer-Krankheit. http://www.deutsche-alzheimer.de/index.php?id=37&no_cache=1&file=8&uid=224 (14.04.2009)
- Artiga MJ, Bullido JM, Sastre I, Recuero M, García MA, Aldudo J, Vázquez J und ValdiviesoF (1998a):** Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of the apolipoprotein E gene. *FEBS Letters* **421**:105-08.
- Artiga MJ, Bullido JM, Frank A, Sastre I, Recuero M, García MA, Lendon CL, Han SW, Morris JC, Vázquez J, Goate A und ValdiviesoF (1998b):** Risk for Alzheimer's disease correlates with transcriptional activity of the *APOE* gene. *Human Molecular Genetics* **7**:1887-92.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS und Donoghue MJ (1995):** The ITS-Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence Angiosperm Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**:247-77.
- Beffert U, Cohn JS, Petit-Turcotte C, Tremblay M, Aumont N, Ramassamy C, Davignon J und Poirier J:** Apolipoprotein E and β -amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Research* **843**:87-94.
- Berg TD, Calnek DS und Grinnell BW (1995):** The Human Apolipoprotein E Gene Is Negatively Regulated in Human Liver HepG2 Cells by the Transcription Factor BEF-1. *Journal of Biological Chemistry* **270**:15447-50.
- Bertram L und Tanzi RE (2008):** Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature Reviews Neuroscience* **9**:768-78.
- Bickel H (2008):** Das Wichtigste 1 – Die Epidemiologie der Demenz. http://www.deutsche-alzheimer.de/index.php?id=37&no_cache=1&file=7&uid=224 (07.04.2009)
- Björkhem I und Meaney S (2004):** Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**:806-15.
- Blanco FM, (O.S.A.) (1880-1883):** Flora de Filipinas / por el P. Fr. Manuel Blanco, agustino calzado, adicionada con el manuscrito inédito del P. Fr. Ignacio Mercado, las obras del P. Fr. Antonio Llanos y de un apéndice con todas las nuevas investigaciones botánicas referentes al Archipiélago Filipino. Gran edicion / hecha á expensas de la provincia de agustinos calzados de Filipinas bajo la direccion científica del P. Fr. Andrés Naves, Atlas I, Establecimiento tipográfico de Plana y C, Manila.
- Blennow K, de Leon MJ und Zetterberg H (2006):** Alzheimer's disease. *Lancet* **368**:387-403.
- Bornemann-Kolatzki K (2004):** Durchführung eines Genomscans mit polymorphen DNA-Markern und Genomic Mismatch Scanning (GMS) bei *Sus scrofa* zur Detektion *Hernia inguinalis/scrotalis* assoziierter Genomregionen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover & Georg-August-Universität Göttingen.
- Bradacs G (2008a):** Ethnobotanical Survey and Biological Screening of Medical Plants from Vanuatu. Dissertation, Universität Regensburg.
- Bradacs G (2008b):** Herbal Medicine of Vanuatu. Regensburg.
- Brouwers N, Sleegers K und Van Broeckhoven C (2008):** Molecular genetics of Alzheimer's disease: An update. *Annals of Medicine* **40**:562-583.
- Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, García MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vázquez J, Goate A und Valdiviesco F (1998):** A polymorphism in the regulatory region of *APOE* associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nature Genetics* **18**:69-71.
- Buttini M, Akeefe H, Lin C, Mahley RW, Pitas RE, Wyss-Coray T und Mucke L (2000):** Dominant Negative Effects of Apolipoprotein E4 Revealed in Transgenic Models of Neurodegenerative Disease. *Neuroscience* **97**:207-10.
- Cedazo-Mínguez A, Hamker U, Meske V, Veh RW, Hellweg R, Jacobi C, Albert F, Cowburn RF und Ohm TG (2001a):** Regulation of Apolipoprotein E secretion in rat primary hippocampal astrocyte cultures. *Neuroscience* **105**:651-61.
- Cedazo-Mínguez A, Hüttinger M und Cowburn R.F (2001b):** β -VLDL protects against A β (1-42) and apoE toxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport* **12**:201-06.

- Cedazo-Mínguez A (2007):** Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular und Molecular Medicine* **11**:1227-38 .
- Chang DJ, Paik YK, Leren TP, Walker DW, Howlett J und Taylor JM (1990):** Characterisation of a Human Apolipoprotein E Gene Enhancer Element and Its Associated Protein Factors. *Journal of Biological Chemistry* **265**:9496-9504.
- Chaturvedula VSP, Sprague S, Schilling JK und Kingston DG (2003):** New Cytotoxic Indole Alkaloids from *Tabernaemontana calcaria* from the Madagascar Rainforest. *Journal of Natural Products* **66**:528-31.
- Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA und LaDu MJ (2002):** Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β -Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *Journal of Biological Chemistry* **277**:32046-53.
- Davies P und Maloney AJF (1976):** Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **308**:1403.
- DeMattos RB, Curtis LK und Williams DL (1998):** A Minimally Lipidated Form of Cell-derived Apolipoprotein E Exhibits Isoform-specific Stimulation of Neurite Outgrowth in the Absence of Exogenous Lipids or Lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **273**:4206-12.
- De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR und Subramani S (1987):** Firefly Luciferase Gene, Structure and Expression in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* **7**:725-37.
- Diamond J (2005):** A Report on Alzheimer's Disease on Current Research. Toronto, Canada, *Alzheimer Society of Canada*.
- Eckert A (2002):** Alois Alzheimer und die Alzheimer Krankheit. *Pharmazie in unserer Zeit* **31**:356-360.
- García MA, Vázquez J, Giménez C, Valdivieso F und Zafra F (1996):** Transcription Factor AP-2 Regulates Human Apolipoprotein E Gene Expression in Astrocytoma Cells. *The Journal of Neuroscience* **16**:7550-56.
- Grundke-Iqbal I, Rolkova G, Konstekova E und Iqbal K (2006):** Biological markers in Alzheimer's disease. *Bratislava Medical Journal* **107**:359-65.
- Gutzmann H (2000):** Das Wichtigste 6 – Die nichtmedikamentöse Behandlung der Alzheimer-Krankheit. <http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet06.pdf> (09.04.2009)
- Haass C und Selkoe DJ (2007):** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**:101-12.
- Hallauer JF, Schons M, Smala A und Berger K (2000):** Untersuchung von Krankheitskosten bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung. *Gesundheitsökonomie und Qualitätsmanagement* **5**: 73-79.
- Hampel H, Padberg F und Möller HJ (2003):** Alzheimer-Demenz: Klinische Verläufe, diagnostische Möglichkeiten, moderne Therapiestrategien. Stuttgart, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH*.
- Hanahan D (1983):** Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.
- Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT und Mendez AJ (1996):** Brain Expression of Apolipoproteins E, J and A-I in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry* **66**:2429-35.
- Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekonius L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scarce,Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW und Huang Y (2003):** Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:10966-71.
- Hawkins E, Butler B, Beck M, O'Grady M, Orr L und Wood K (2002):** Dual GloTM Luciferase Assay System: Convenient Dual Reporter Measurement in 96- and 384-Well Plates. *Promega Notes* **81**:22-26.
- Hempfen CH und Fischer T (2007):** Leitfaden Chinesische Phytotherapie, 2. Auflage, München, *Elsevier GmbH*.
- Herdegen T, Tölle TR und Bähr M (1997):** Klinische Neurobiologie: Molekulare Pathogenese und Therapie von neurobiologischen Erkrankungen. Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.
- Hock C und Nitsch RM (2000):** Die Alzheimer-Demenz. *Praxis* **89**:529-540.
- Huang Y, Liu XQ, Wyss-Coray T, Brecht WJ, Sanan DA und Mahley RW (2001):** Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:8838-43.
- Huang Y, Weisgraber KH, Mucke L und Mahley RW (2004):** Apolipoprotein E. *Journal of Molecular Neuroscience* **23**:189-204.
- Internetquelle 1-9:** siehe hinten
- Iqbal K und Grundke-Iqbal I (2008):** Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of Cellular und Molecular Medicine* **12**:38-55.

- IQWiG (2007):** Cholinesterasehemmer bei Alzheimer Demenz. Abschlussbericht A05-19A. Köln, *Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen*.
- IQWiG (2008a):** Memantin bei Alzheimer Demenz. Vorbericht A05-19C. Köln, *Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen*.
- IQWiG (2008b):** Ginkgohaltige Präparate bei Alzheimer Demenz. Abschlussbericht A05-19B. Köln, *Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen*.
- Keller JN (2006):** Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* **5**:1-13.
- Kersten T, Daniel C, König GM und Knöß W (2008):** Das Potenzial PCR-basierter Markermethoden zur Identifizierung von Arzneipflanzen. *Zeitschrift für Phytotherapie* **29**:122-28.
- Kurtz R, Chen F, Pandey V, Andre C und Batey D (2004):** Haplotype Analysis Using a Novel Real-Time qPCR Amplification Strategy on the MJ Research® Opticon™ Continuous Fluorescence Detection System, Application Note Vol. 2, No. 12. San Francisco, Ca, USA, *MJ Research, Incorporated*.
- Lahiri DK (2004):** Apolipoprotein E as a Target for Developing New Therapeutics for Alzheimer's Disease Based on Studies From Protein, RNA, and Regulatory Region of the Gene. *Journal of Molecular Neuroscience* **23**:225-33.
- Lambert JC, Pasquier F, Cotel D, Frigard B, Amouyel P und Chartier-Harlin MC (1998a):** A new polymorphism in the *APOE* promoter associated with risk of developing Alzheimer's Disease. *Human Molecular Genetics* **7**:533-40.
- Lambert JC, Berr C, Pasquier F, Delacourte A, Frigard B, Cotel D, Pérez-Tur J, Mouroux V, Mohr M, Cécyre D, Galasko D, Lendon C, Poirier J, Hardy J, Mann D, Amouyel P und Chartier-Harlin MC (1998b):** Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural *APOE* gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics* **7**:1511-16.
- Lange K (2008):** NO-Donor-Hybridverbindungen und andere Derivate des Flurbiprofens als potenzielle Alzheimer-Therapeutika. Dissertation, Universität Jena.
- Lathuillière P, Olivier L und Le Men J (1966):** On the alkaloids of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. (Apocynaceae). *Annales pharmaceutiques françaises* **24**:547-49.
- Lathuillière P, Olivier L, Lévy J und Le Men J (1970):** Alkaloids of *Ervatamia pandacaqui* Pichon (*Tabernaemontana pandacaqui* Poir.), Apocynaceae. *Annales pharmaceutiques françaises* **28**:57-62.
- Laws SM, Hone E, Taddei K, Harper C, Dean B, McClean C, Masters C, Lautenschlager N, Gandy SE und Martins RN (2002):** Variation at the *APOE* -491 promoter locus is associated with altered brain levels of apolipoprotein E. *Molecular Psychiatry* **7**:886-90.
- Laws SM, Hone E, Gandy S und Martins RN (2003):** Expanding the association between the *APOE* gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for *APOE* promoter polymorphisms and alterations in *APOE* transcription. *Journal of Neuroscience* **84**:1215-36.
- Leschik J (2005):** Funktionelle Interaktionen von Tau mit anderen Proteinen, die bei der Alzheimer'schen Krankheit beteiligt sind. Dissertation, Universität Osnabrück.
- Liu W und Saint DA (2002):** Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **294**:347-53.
- Llaverias G, Rebollo A, Pou J, Vázquez-Carrera M, Sánchez RM, Laguna JC und Alegret M (2005):** Effects of rosiglitazone and atorvastatin on the expression of genes that control cholesterol homeostasis in differentiating monocytes. *Biochemical Pharmacology* **71**:605-14.
- Lüllmann H und Mohr K (2001):** Taschenatlas der Pharmakologie, 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, *Georg Thieme Verlag*.
- Mägdefrau K (1992):** Geschichte der Botanik: Leben und Leistung großer Forscher. 2. Auflage. Stuttgart, *G.Fischer*.
- Mahley RW (1988):** Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science* **240**:622-30.
- Mahley RW und Rall SC Jr. (2000):** Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **1**:507-37.
- Mahley RW, Weisgraber KH und Huang Y (2006):** Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:5644-51.
- Marques MA und Crutcher KA (2003):** Apolipoprotein E-Related Neurotoxicity as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience* **20**:327-37.
- Michikawa M, Fan Q-W, Isobe I und Yanagisawa K (2000):** Apolipoprotein E Exhibits Isoform-Specific Promotion of Lipid Efflux from Astrocytes und Neurons in Culture. *Journal of Neurochemistry* **74**:1008-16.

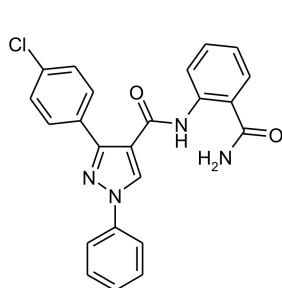
- Morrison C und Gannon F (1994):** The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochimica et Biophysica Acta* **1219**:493-98.
- Mosmann T (1983)** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**:55-63.
- Näslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P und Buxbaum JD (2000):** Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *Journal of the American Medical Association* **283**:1571-77.
- Newman M, Musgrave FI und Lardelli M (2007):** Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochimica et Biophysica Acta* **1772**:285-97.
- Niklewski G (2006):** Aktuelles zur Diagnostik und Therapie der Alzheimer Demenz. *Bayerisches Ärzteblatt* **10**:482-84.
- OZ Biosciences:** DreamFect™ Instruction Manual, Version 2.1, Marseille, Frankreich , *OZ Biosciences*.
- Pfaffl MW (2001):** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**:2002-07.
- Pfaffl MW (2003):** Lifestock Transcriptomics: Quantitative mRNA Analytics in Molecular Endocrinology and Physiology, Habilitation, Chair of Physiology, Department of Animal Science, Center of Life and Food Sciences, Freising.
- Poirier J (1999):** Apolipoprotein E: A Pharmacogenetic Target for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Molecular Diagnosis* **4**:335-41.
- Poirier J (2008):** Apolipoprotein E represents a potent gene-based therapeutic target for the treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* **4**:S91-97.
- Pratchayasakul W, Pongchaidecha A, Chattipakorn N und Chattipakorn S (2008):** Ethnobotany & ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricata*. *Indian Journal of Medical Research* **127**:317-335.
- Promega (2005):** pGL4 Luciferase Reporter Vectors, Technical Manual, Version August 2005. Madison, WI, USA, *Promega*.
- Promega (2006a):** Bright Glo™ Luciferase Assay System, Technical Manual, Version April 2006. Madison, WI, USA, *Promega*.
- Promega (2006b):** Dual Glo™ Luciferase Assay System, Technical Manual, Version Juni 2006. Madison, WI, USA, *Promega*.
- Promega (2007):** pRL-TK Vector, Technical Manual, Version Oktober 2007. Madison, WI, USA, *Promega*.
- Qiagen (2002):** QIAquick Spin Handbook, Version Juli 2002. Hilden, *Qiagen*.
- Qiagen (2004):** Critical Factors for successful Real-Time PCR, Version Januar2004. Hilden, *Qiagen*.
- Quiagen (2006):** DNeasy Plant Handbook, Version Juli 2006. Hilden, *Qiagen*.
- Rafii MS und Aisen PS (2009):** Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BioMed Central Medicine* **7**:7.
- Rapp A, Gmeiner B und Hüttinger M (2006):** Implication of apoE isoforms in cholesterol metabolism by primary rat hippocampal neurons and astrocytes. *Biochimie* **88**:473-83.
- Rasmussen TH und Nielsen JB (2002):** Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). *Biomarkers* **7**:322-36.
- Robert M und Manthuranath PS (2007):** Tau und tauopathies. *Neurology India* **55**: 11-16.
- Roche Diagnostics (2005)** Cell Proliferation Kit I (MTT), Package Insert, Version September 2005. Mannheim, *Roche Diagnostics*.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-91.
- Salero E, Pérez-Sen R, Aruga J, Giménez C und Zafra F (2001):** Transcription Factors Zic1 und Zic2 Bind and Transactivate the Apolipoprotein E Gene Promoter. *Journal of Biological Chemistry* **276**:1881-88.
- Sambrook J und Russel D (2001):** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schweiger HD (2008):** Antidementiva gegen den schleichenden Abbau. *Pharmazeutische Zeitung* **34**:12-18.
- Simon TM, Kopish A und Kopish K (2008):** Luciferase Reporter Assays: Powerful, Adaptable Tools for Cell Biology Research. *Cell Notes* **21**:23-26.
- Soininen H, Kosunen O, Helisalmi S, Mennermaa A, Paljärvi L, Talasniemi S, Ryyänänen M und Riekkinen P Sr (1995):** A severe loss of choline acetyltransferase in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying apolipoprotein ε4 allele. *Neuroscience Letters* **187**:79-82.
- Stöger EA und Friedl F (2009):** Arzneibuch der chinesischen Medizin, Aktualisierungslieferung 2009. Stuttgart, *Deutscher Apotheker Verlag*.

- Stratagene (2004):** QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Version 200. La Jolla, CA, USA, *Stratagene*
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Goedert M, Saunders AM, Huang D, Corder EH, Dong L-M, Jakes R, Alberts MJ, Gilbert JR, Han S-H, Hulette C, Einstein G, Schmechel DE, Pericak-Vance MA und Roses AD (1994):** Hypothesis: Microtubule Instability and Paired Helical Filament Formation in the Alzheimer Disease Brain Are Related to Apolipoprotein E Genotype. *Experimental Neurology* **125**:163-71.
- Taddei K, Clarnette R, Gandy SE und Martins RN (1997):** Increased plasma apolipoprotein E (apoE) levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* **223**:29-32.
- Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R und Scheffer JJC (1989):** Hippocratic screening of ethanolic extracts from two *Tabernaemontana* species. *Journal of Ethnopharmacology* **27**:99-106.
- Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R und Scheffer JJC (1990):** Pharmacological Activities of *Tabernaemontana pandacaqui*. *Planta Medica* **56**:688.
- Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R und Scheffer JJC (1998a):** Cardiovascular activity of the crude alkaloidal fraction from *Tabernaemontana pandacaqui* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* **59**:131-37.
- Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R und Scheffer JJC (1998b):** Neuropharmacological activities of the crude alkaloidal fraction from stems of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *Journal of Ethnopharmacology* **62**:229-34.
- Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R und Scheffer JJC (2003):** Anti-inflammatory, antipyretic and antinoceptive activities of *Tabernaemontana pandacaqui* Poir. *Journal of Ethnopharmacology* **84**:31-35.
- Tolar M, Keller JN, Chan S, Mattson MP, Marques MA und Crutcher KA (1999):** Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate neurotoxicity. *Journal of Neuroscience* **19**:7100-10.
- Utermann G, Steinmetz A und Weber W (1982):** Genetic Control of Human Apolipoprotein Polymorphism: Comparison of One- and Two-Dimensional Techniques of Isoprotein Analysis. *Human Genetics* **60**:344-51.
- Utermann G, Hees M und Steinmetz A (1977):** Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinaemia in man. *Nature* **269**:604-07.
- van Beek TA, Verpoorte R, Baerheim Svendsen A, Leeuwenberg AJM und Bisset NG (1984):** *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A Review of its Taxonomy, Phytochemistry, Ethnobotany and Pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **10**:1-156.
- Whalley LJ, Deary IJ, Appleton CL und Starr JM (2004):** Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging. *Ageing Research Reviews* **3**:369-82.
- Weyerer S (2005):** Heft 28 – Altersdemenz. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Berlin, *Robert Koch Institut*.
- Wyne KL, Schreiber JR, Larsen AL und Getz GS (1989):** Regulation of Apolipoprotein E Biosynthesis by cAMP and Phorbol Ester in Rat Ovarian Granulosa Cells. *Journal of Biological Chemistry* **15**:981-89.
- Yanisch-Perron C, Vieira J und Messing J (1985):** Improved M13 Phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- Zannis VI und Breslow JL (1981):** Human Very Low Density Lipoprotein E Isoprotein Polymorphism is Explained by Genetic Variation and Posttranslational Modification. *Biochemistry* **20**:1033-41.

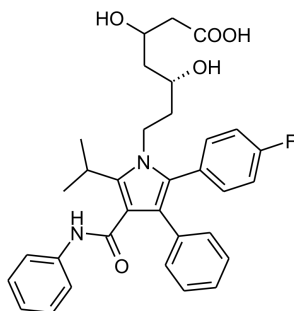
Internetquellen

- Internetquelle 1:** <http://www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/symptome.htm> (08.04.2009)
- Internetquelle 2:** <http://www.netdoktor.de/Magazin/Stadien-der-Alzheimer-Krankheit-2255.html> (08.04.2009)
- Internetquelle 3:** http://www.focus.de/gesundheit/ratgeber/gehirn/alzheimer/der-verlauf_aid_24035.html (08.04.2009)
- Internetquelle 4:** <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations> (14.04.09)
- Internetquelle 5:** <http://www.efloras.org> (20.04.09)
- Internetquelle 6:** <http://www.dimdi.de/static/de/klassi/diagnosen/icd10/htmlgm2009/index.htm> (20.04.09)
- Internetquelle 7:** <http://www.deutsche-alzheimer.de>
- Internetquelle 8:** <http://www.medfuehrer.de/cms/?f=5&n=10&ns=240&sn=35&printmode=1&> (21.04.09)
- Internetquelle 9:** http://www.promega.com/vectors/reporter_vectors.htm#b06b (27.04.09)

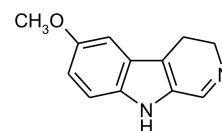
Anhang



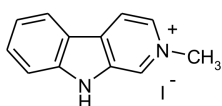
ANTHCL



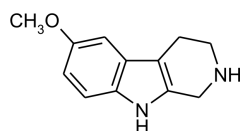
Atorvastatin



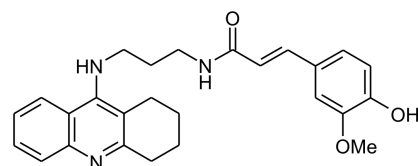
E 5



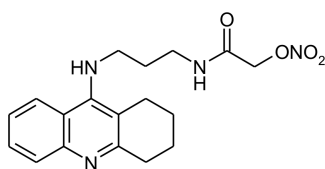
E 8



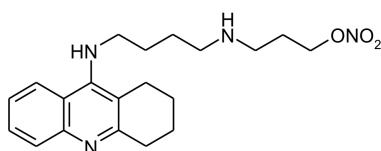
E 11



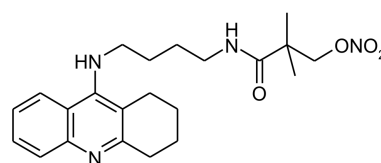
FL 15



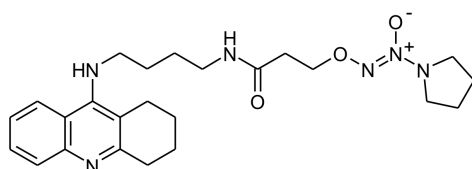
FL 16



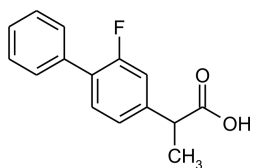
FL 38



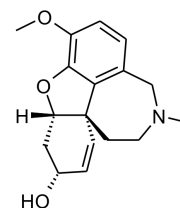
FL 44



FL 56

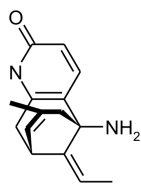


Flurbiprofen

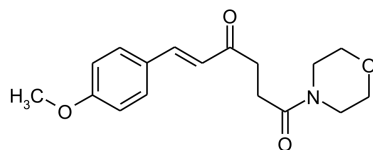


Galantamin

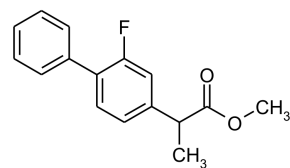
Abbildung A1:
Strukturformeln der getesteten Reinsubstanzen (I).



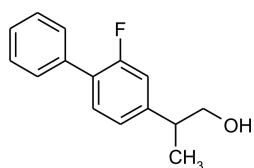
Huperzin A



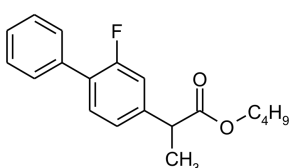
INTOME



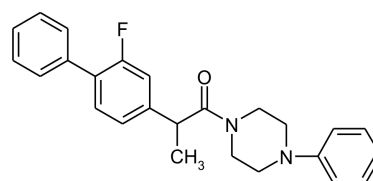
LEKL 1



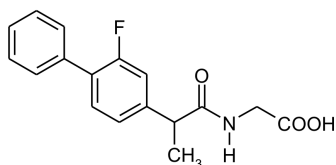
LEKL 4



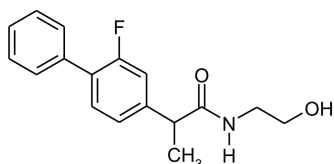
LEKL 8



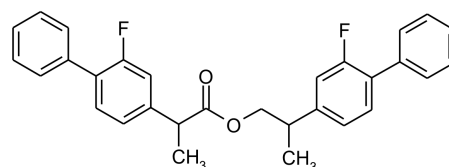
LEKL 12



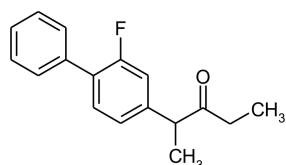
LEKL 20



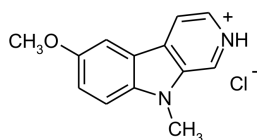
LEKL 24



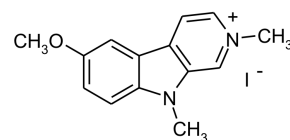
LEKL 27



LEKL 28

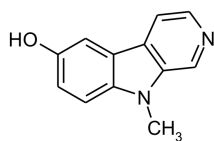


LEYS 513

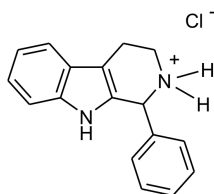


LEYS 514

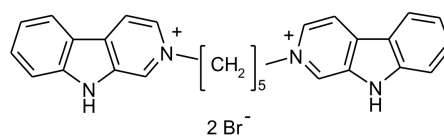
Abbildung A2:
Strukturformeln der getesteten Reinsubstanzen (II).



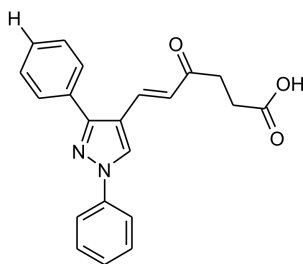
LEYS 517



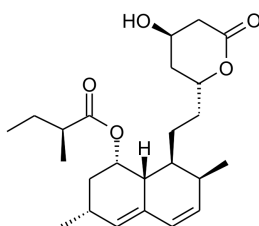
LEYS 530



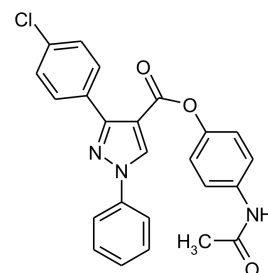
LEYS 534



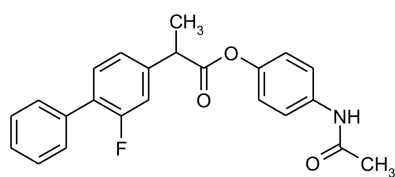
LEVH



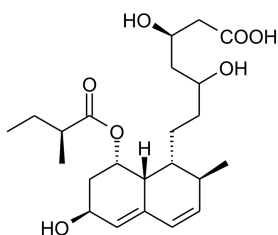
Lovastatin



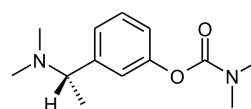
PARCL



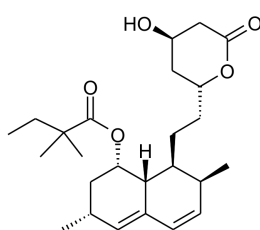
PARFLU



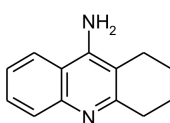
Pravastatin



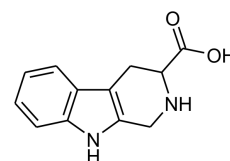
Rivastigmin



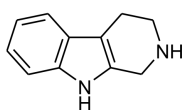
Simvastatin



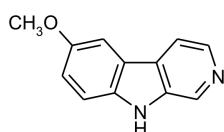
Tacrin



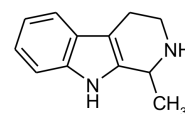
TCC



THBC



Y 3



Y 20

Abbildung A3:
Strukturformeln der getesteten Reinsubstanzen (III).

T.pan II	1	TCGAATCCTGCGAAGCAGACGACCCGCGAACTCGTTCTACACCGGGCATAGGTCGGGGGT	60
T.pan I	1M.....	60
T.pan II	61	CTCCCTCGGCCGTTGCCCCCGGCCGGCTGCCCTCTCGGGGGCTCCCGGCCGTGCA	120
T.pan I	61Y.....	120
T.pan II	121	AACCAACAAAACCCCGGCGCGGAAAGCGCCAAGGACTACTTAAAAACGGAATGCCTTCCC	180
T.pan I	121	180
T.pan II	181	TCGGCCCTGCCCCGTTGCGCGGTGCGGGTCTCGGGAGCAAGGGCGCCTGTGCAATACTGAAC	240
T.pan I	181	240
T.pan II	241	GACTCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAACGCGATA	300
T.pan I	241	300
T.pan II	301	CTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGA	360
T.pan I	301	360
T.pan II	361	AGCCACTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCTCCCTCCC	420
T.pan I	361Y.....	420
T.pan II	421	CCCTTCCATTCTTCTGTGTTGGAACGGGGGGCCGTGCGGGGGAGGGCGGAAAATGGCCTC	480
T.pan I	421Y.....Y.....	480
T.pan II	481	CCGTGCTAACC CGCGCCGCTAAACCCCGGTCCCCAGCCATGGACGTCACGACAAGTG	540
T.pan I	481Y.....M.....	540
T.pan II	541	GTGGTTGAAACCTCAACTCGATTGCGAGTCGTGCGACGCCCCGTGGCCGGGAGACCGAT	600
T.pan I	541	600
T.pan II	601	CGACCCTCTAGCGAGCCGACGCTCGCCACGACC	633
T.pan I	601Y.....	633

T.pan I = *Tabernaemontana pandacaqui* LAM. (I)

T.pan II = *Tabernaemontana pandacaqui* LAM. (II)

ITS 1-Gen M = A oder C
 5.8S-rRNA Y = C oder T
 ITS2 -Gen

Abbildung A4:
Sequenzvergleich der ITS-Regionen von *T. pandacaqui* I und II.

Tabelle A1:

Ergebnisse der *Real-Time-PCR* zur Genotypisierung der 1321N1 Zellen bezüglich der *APOE*-Allele.

Klon	Getestetes Allel	c _t -Wert	Klon	Getestetes Allel	c _t -Wert
1	<i>ApoE</i> εx	31,74	4	<i>ApoE</i> εx	32,47
	<i>ApoE</i> ε2	no c _t		<i>ApoE</i> ε2	18,89
	<i>ApoE</i> ε3	33,16		<i>ApoE</i> ε3	35,20
	<i>ApoE</i> ε4	18,16		<i>ApoE</i> ε4	37,79
2	<i>ApoE</i> εx	34,33	Kontrolle (Plasmid pOTB7ApoE3)	<i>ApoE</i> εx	no c _t
	<i>ApoE</i> ε2	21,40		<i>ApoE</i> ε2	27,35
	<i>ApoE</i> ε3	35,93		<i>ApoE</i> ε3	16,89
	<i>ApoE</i> ε4	38,99		<i>ApoE</i> ε4	24,48
3	<i>ApoE</i> εx	35,70			
	<i>ApoE</i> ε2	no c _t			
	<i>ApoE</i> ε3	33,96			
	<i>ApoE</i> ε4	21,35			

Tabelle A2:

Ergebnisse der Luciferase-Assays in stabil transfizierten 1321N1-Zelllinien nach einer 24-stündigen Inkubation mit Dibutryl-cAMP (1 mM).

Zelllinie	<i>fold change</i> (n = 3; ± SD)	Student's t-Test
25027 Klon J	0,76 ± 0,12	p < 0,05
MK 25037	0,47 ± 0,04	p < 0,001
25037 Klon 8	0,63 ± 0,04	p < 0,001
MK 25038	0,49 ± 0,21	p < 0,05
25038 Klon L3	0,61 ± 0,10	p < 0,01
MK 25039	0,49 ± 0,01	p < 0,001
25039 Klon 6	0,36 ± 0,02	p < 0,001

Tabelle A3:

Kenngrößen der getesteten Reinsubstanzen: Konzentration, Luciferase-Aktivität (1321N1, 25037 Klon 8) und Zellvitalität (MTT-Test, 1321N1, 25037 Klon 8). Gekennzeichneten Extrakte (ZT) wurden aufgrund zytotoxischer Effekte nicht weiter untersucht.

Substanz	Getestete Konzentration [μM]	<i>fold change</i>	Vitalität [%]
ANTHCL	10	1,38	67,78
	100	1,22	31,26
Atorvastatin	10	0,45	86,74
	100	0,29	70,55
E 5	10	0,52	107,46
	100	0,04 (ZT)	3,34
E 8	10	0,78	80,91
	100	1,13	88,78
E 11	10	0,85	95,31
	100	0,65	86,12

Tabelle A3: Fortsetzung

Substanz	Getestete Konzentration [µM]	<i>fold change</i>	Vitalität [%]
FL 15	10	0,97	93,19
	100	0,02 (ZT)	19,66
FL 16	10	0,58	92,20
	100	0,04 (ZT)	1,57
FL 38	10	0,54	56,86
	100	0,002 (ZT)	2,97
FL 44	10	0,79	106,30
	100	0,61 (ZT)	15,29
FL 56	10	1,05	94,85
	100	0,17 (ZT)	6,40
Flurbiprofen	10	0,98	97,71
	100	0,95	98,49
Galantamin	10	0,91	108,21
	100	0,88	105,02
Huperzin A	10	0,82	109,77
	100	0,90	103,22
INTOME	10	1,01	98,46
	100	1,29	93,70
LEKL 1	10	1,27	98,59
	100	1,83	60,98
LEKL 4	10	1,31	96,36
	100	1,71	73,54
LEKL 8	10	1,01	99,29
	100	0,85	50,95
LEKL 12	10	0,83	91,07
	100	0,68	35,41
LEKL 20	10	1,06	97,64
	100	1,03	97,10
LEKL 24	10	1,11	95,22
	100	1,32	79,70
LEKL 27	10	0,78	91,33
	100	0,82	82,14
LEKL 28	10	1,24	97,01
	100	1,74	57,68
LEYS 513	10	1,00	97,07
	100	1,19	77,88
LEYS 514	10	0,79	98,91
LEYS 517	10	1,94	64,15
LEYS 530	10	0,79	79,02
	100	0,22 (ZT)	2,52
LEYS 534	10	0,85	83,42
	100	0,88	74,66
LEVH	10	1,02	97,40
	100	0,98	55,78

Tabelle A3: Fortsetzung

Substanz	Getestete Konzentration [µM]	<i>fold change</i>	Vitalität [%]
Lovastatin	10	0,40	84,41
	100	0,40 (ZT)	28,96
PARCL	10	0,75	94,04
	100	0,41 (ZT)	19,74
PARFLU	10	1,04	99,28
	100	1,77 (ZT)	32,96
Pravastatin	10	0,98	102,11
	100	0,94	100,48
Rivastigmin	10	0,84	107,99
	100	0,91	106,12
Simvastatin	10	0,38	83,71
	100	0,38 (ZT)	11,81
Tacrin	10	0,93	103,15
	100	0,43	72,65
TCC	10	0,92	108,52
	100	1,00	100,20
THBC	10	1,07	98,65
	100	0,65	56,98
Y 3	10	0,96	101,77
	100	0,74	89,59
Y 20	10	0,97	66,86
	100	0,50	72,02

Tabelle A4:

Ergebnisse des Luciferase-Assays (25037 Klon 8) mit Reinsubstanzen aus dem Labor von Prof. Dr. Jochen Lehmann (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena). (n = 3)

Substanz	Getestete Konzentration [µM]	<i>fold change</i> (n = 3; ± SD)	Student's t-Test
Atorvastatin	10	0,40 ± 0,05	p < 0,001
	50	0,31 ± 0,05	p < 0,001
LEKL 1	10	1,58 ± 0,04	p < 0,001
	50	1,87 ± 0,12	p < 0,001
LEKL 4	10	2,10 ± 0,18	p < 0,001
	50	2,44 ± 0,13	p < 0,001
LEKL 28	10	1,20 ± 0,12	p < 0,05
	50	1,57 ± 0,11	p < 0,001
LEYS 517	5	1,17 ± 0,08	p < 0,05
	10	1,44 ± 0,16	p < 0,01

Tabelle A5:

Kenngrößen der Extrakte aus Drogen der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM 1 – TCM 11): Auszugsmittel, Luciferase-Aktivität (c = 50 mg/ml, 25037 Klon 8) und Zellvitalität (MTT-Test, c = 50 mg/ml 25037 Klon 8). Gekennzeichneten Extrakte (ZT) wurden aufgrund zytotoxischer Effekte nicht weiter untersucht.

Extrakt	Pflanze, Familie	Auszugsmittel	fold change	Vitalität [%]
TCM 1 M	<i>Arisaema erubescens</i> (Wall.) Schott, Araceae	Methanol	1,00	96,51
TCM 1 W		Wasser	1,25	84,13
TCM 2 M	<i>Curcuma wenyujin</i> Y.H. Chen et C. Ling., Zingiberaceae	Methanol	0,99	101,74
TCM 2 W		Wasser	1,23	87,79
TCM 3 M	<i>Drynaria fortunei</i> (Kunze) J. Sm., Polypodiaceae	Methanol	0,67	90,61
TCM 3 W		Wasser	1,21	87,21
TCM 4 M	<i>Gleditsia sinensis</i> LAM, Fabaceae	Methanol	0,38 (ZT)	6,41
TCM 4 W		Wasser	0,79 (ZT)	78,76
TCM 5 M	<i>Caesalpinia sappan</i> L., Caesalpinaceae	Methanol	0,00 (ZT)	20,77
TCM 5 W		Wasser	0,25 (ZT)	53,80
TCM 6 M	<i>Polygonatum sibiricum</i> Red., Liliaceae	Methanol	0,67	73,87
TCM 6 W		Wasser	1,19	78,98
TCM 7 M	<i>Cynomorium songaricum</i> Rupr., Cynomoriaceae	Methanol	0,69	84,81
TCM 7 W		Wasser	1,18	82,10
TCM 8 M	<i>Coptis chinensis</i> Franch, Ranunculaceae	Methanol	0,67	95,88
TCM 8 W		Wasser	1,22	60,32
TCM 9 M	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi, Lamiaceae	Methanol	1,99	91,75
TCM 9 W		Wasser	2,45	73,03
TCM 10 M	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis, Rubiaceae	Methanol	0,96	88,96
TCM 10 W		Wasser	1,45	93,44
TCM 11 M	<i>Sophora flavescens</i> Ait., Fabaceae	Methanol	0,82	100,16
TCM 11 W		Wasser	1,00	99,74

Tabelle A6:

Kenngrößen der Pflanzenextrakte der Wildsammlung im Inselstaat Vanuatu: Auszugsmittel und Luciferase-Aktivität (c = 50 mg/ml, 25027 Klon J). Gekennzeichneten Extrakte (ZT) wurden aufgrund zytotoxischer Effekte nicht weiter untersucht.

Extrakt	Pflanze, Familie	Auszugsmittel	fold change
0476-1.2 A	<i>Aidia racenosa</i> (CAV.) D.D. TIRVENG., Rubiaceae	Dichlormethan	0,76
0476-1.2 B		Ethylacetat	0,60
0476-1.2 C		Methanol	1,04
0476-1.6 A	<i>Dysoxylum arborescens</i> (BL.) MIQ., Meliaceae	Dichlormethan	0,50
0476-1.6 B		Ethylacetat	0,63
0476-1.6 C		Methanol	0,93
0476-1.5 A	<i>Allophylus timoriensis</i> DC. BL., Sapindaceae	Dichlormethan	0,71
0476-1.5 B		Ethylacetat	0,84
0476-1.5 C		Methanol	0,98
2766-1.1 A	<i>Acalypha grandis</i> BENTH., Euphorbiaceae	Dichlormethan	0,68
2766-1.1 B		Ethylacetat	0,89
2766-1.1 C		Methanol	1,32
2766-1.9 A	<i>Pipturus argenteus</i> WEDD., Urticaceae	Dichlormethan	0,99
2766-1.9 B		Ethylacetat	0,97
2766-1.9 C		Methanol	0,75

Tabelle A6: Fortsetzung

Extrakt	Pflanze, Familie	Auszugsmittel	fold change
2766-1.9 A	<i>Pipturus argenteus</i> WEDD., Urticaceae	Dichlormethan	0,99
2766-1.9 B		Ethylacetat	0,97
2766-1.9 C		Methanol	0,75
2966-2 A	<i>Tabernaemontana pandacahui</i> LAM. I, Apocynaceae	Dichlormethan	0,68
2966-2 B		Ethylacetat	1,88
2966-2 C		Methanol	1,91
2576-10 A	<i>Tabernaemontana pandacahui</i> LAM. II, Apocynaceae	Dichlormethan	2,93
2576-10 B		Ethylacetat	1,53
2576-10 C		Methanol	2,56
3066-2 A	<i>Syzygium malaccense</i> (L.) MERR. & L.M. PERRY, Myrtaceae	Dichlormethan	0,83
3066-2 B		Ethylacetat	0,83
3066-2 C		Methanol	0,75
2576-4 A	<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) SM., Zingiberaceae	Dichlormethan	0,35
2576-4 B		Ethylacetat	0,50
2576-4 C		Methanol	0,79
0276-1 A	<i>Euodia latifolia</i> DC., Rutaceae	Dichlormethan	0,73
0276-1 B		Ethylacetat	0,64
0276-1 C		Methanol	0,80
2176-1 A	<i>Intsia bijuga</i> (COLEBR.) O. KTZE., Leguminosae-Caesalpinioideae	Dichlormethan	0,74
2176-1 B		Ethylacetat	0,84
2176-1 C		Methanol	0,79
0476-2.1 A	<i>Gyrocarpus americanus</i> JACQ., Hernandiaceae	Dichlormethan	0,83
0476-2.1 B		Ethylacetat	0,96
0476-2.1 C		Methanol	1,05
1686-1.2 A	<i>Bidens pilosa</i> L., Asteraceae	Dichlormethan	0,84
1686-1.2 B		Ethylacetat	0,71
1686-1.2 C		Methanol	0,98
1786-6F A	<i>Baccaurea stylaris</i> MUELL. ARG., Phyllanthaceae	Dichlormethan	1,07
1786-6F B		Ethylacetat	1,22
1786-6F C		Methanol	1,19
1786-6C A	<i>Baccaurea stylaris</i> MUELL. ARG., Phyllanthaceae	Dichlormethan	1,13
1786-6C B		Ethylacetat	0,72
1786-6C C		Methanol	1,04
1686-1.13 A	<i>Grewia inmac</i> GUILL., Sparrmanniaceae	Dichlormethan	0,81
1686-1.13 B		Ethylacetat	0,73
1686-1.13 C		Methanol	0,99
2176-10 A	<i>Macropiper latifolium</i> (L.F.), Piperaceae	Dichlormethan	0,84
2176-10 B		Ethylacetat	0,96
2176-10 C		Methanol	1,04
2176-7L1 A	<i>Macaranga tanarius</i> (L.) MUELL. ARG., Euphorbiaceae	Dichlormethan	0,50
2176-7L1 B		Ethylacetat	1,43
2176-7L1 C		Methanol	1,37
2176-7L2F A	<i>Macaranga dioica</i> MUELL. ARG., Euphorbiaceae	Dichlormethan	0,39 (ZT)
2176-7L2F B		Ethylacetat	0,49 (ZT)
2176-7L2F C		Methanol	1,07
2176-7L2C A	<i>Macaranga dioica</i> MUELL. ARG., Euphorbiaceae	Dichlormethan	0,95
2176-7L2C B		Ethylacetat	0,99
2176-7L2C C		Methanol	0,95
0186-12 A	<i>Dracontomelon vitiense</i> ENGL., Anacardiaceae	Dichlormethan	1,08
0186-12 B		Ethylacetat	1,07
0186-12 C		Methanol	0,65

Tabelle A7:

Ergebnisse des Luciferase-Assays (25027 Klon J) nach der Vermessung der Extrakte der Drogen aus dem Inselstaat Vanuatu ($c = 50 \text{ mg/ml}$, $n = 3$).

Extrakt	<i>fold change</i> ($n = 3$; $\pm \text{SD}$)	Student's t-Test
0476-1.2 B	$0,83 \pm 0,04$	$p < 0,05$
0476-1.6 A	$1,03 \pm 0,08$	$p > 0,05$
0476-1.6 B	$0,98 \pm 0,02$	$p > 0,05$
2966-2 B	$1,48 \pm 0,06$	$p < 0,001$
2966-2 C	$2,32 \pm 0,13$	$p < 0,001$
2576-10 A	$4,09 \pm 0,26$	$p < 0,001$
2576-10 B	$1,31 \pm 0,28$	$p > 0,05$
2576-10 C	$3,57 \pm 0,33$	$p < 0,001$
2576-4 A	$0,42 \pm 0,06$	$p < 0,001$
2576-4 B	$0,60 \pm 0,07$	$p < 0,001$
0276-1 B	$0,82 \pm 0,07$	$p < 0,05$
2176-7L1 A	$0,49 \pm 0,11$	$p < 0,01$
0186-12 C	$1,06 \pm 0,07$	$p > 0,05$

Tabelle A8:

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse des *APOE*-Gens mittels *Real-Time*-RT-PCR in 1321N1-Zellen mit Fraktionen und Extrakten der Pflanze *T. pandacaqui* ($c = 50 \text{ mg/ml}$, je ein Duplett, $n = 3$).

Stimulans	<i>fold change</i> ($n = 3$; $\pm \text{SD}$)	Student's t-Test
A 1 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,47 \pm 0,05$	$p < 0,001$
A 3 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,68 \pm 0,21$	$p > 0,05$
B 1 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,58 \pm 0,13$	$p < 0,01$
C 6 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,50 \pm 0,09$	$p < 0,001$
D 5 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,55 \pm 0,17$	$p < 0,05$
E 3 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,54 \pm 0,05$	$p < 0,001$

Tabelle A9:

Ergebnisse der Genexpressionsanalyse des *APOE*-Gens mittels *Real-Time*-RT-PCR in U87-MG-Zellen mit Fraktionen und Extrakten der Pflanze *T. pandacaqui* ($c = 50 \text{ mg/ml}$, je ein Duplett, $n = 3$).

Stimulans	<i>fold change</i> ($n = 3$; $\pm \text{SD}$)	Student's t-Test
A 1 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,65 \pm 0,12$	$p < 0,01$
A 2 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,66 \pm 0,09$	$p < 0,01$
A 3 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,54 \pm 0,03$	$p < 0,001$
B 1 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,69 \pm 0,12$	$p < 0,05$
C 6 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,46 \pm 0,10$	$p < 0,001$
C 7 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$1,02 \pm 0,13$	$p > 0,05$
D 5 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,47 \pm 0,00$	$p < 0,001$
E 3 (50 $\mu\text{g/ml}$)	$0,41 \pm 0,04$	$p < 0,001$

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Alois Alzheimer	1
Abbildung 2:	Prozentuale Häufigkeit verschiedener Demenzursachen	3
Abbildung 3:	Senile Plaques und neurofibrilläre Bündel im cerebralen Cortex	4
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP)	6
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese	7
Abbildung 6:	Stadien- und symptomgerechter Einsatz von Antidementiva und Psychopharmaka bei Alzheimer-Demenz	13
Abbildung 7:	Isoform-bestimmende Basentriplets der Aminosäuren 112 und 158.....	20
Abbildung 8:	Modell-Darstellung des humanen Apolipoprotein E	22
Abbildung 9:	Schematische Darstellung der <i>APOE</i> -Promotorregion	27
Abbildung 10:	<i>Tabernaemontana pandacacui</i> LAM.	31
Abbildung 11:	Hauptkomponenten der Alkaloidfraktion aus <i>T. pandacacui</i>	32
Abbildung 12:	Biolumineszenz-Reaktion, katalysiert durch <i>Firefly</i> -Luciferase	62
Abbildung 13:	Plattenbelegung einer 96well-Mikrotiterplatte des Luciferase-Reporter-Gen-Assays (stabil transfizierte Zellen).....	63
Abbildung 14:	Testprinzip des MTT-Assays	64
Abbildung 15:	Biolumineszenz-Reaktion, katalysiert durch <i>Renilla</i> -Luciferase.....	70
Abbildung 16:	Schematische Darstellung der ITS-Region	72
Abbildung 17:	Allel-bestimmende SNPs in der Basensequenz der kodierenden Region des <i>APOE</i> -Gens (schematisch).....	81
Abbildung 18:	SNPs in der kodierenden Region des <i>APOE</i> -Gens der 1321N1-Zellen..	82
Abbildung 19:	<i>Real-Time</i> -PCR (Klon 2 und 3) zur Detektion der SNPs in der kodierenden Region des <i>APOE</i> -Gens der Astrozytomzelllinie 1321N1.	84
Abbildung 20:	Polymorphismen in der <i>APOE</i> -Promotorregion der 1321N1-Zellen.....	85
Abbildung 21:	Reportervektor pGL4.14 (Promega)	86
Abbildung 22:	PCR zur Detektion der <i>Luciferase</i> -Sequenz in genomischer DNA der Mischkulturen der 1321N1-Zellen	92
Abbildung 23:	Validierung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays (stabile 1321N1-Zelllinien) mit Dibutyryl-cAMP	94
Abbildung 24:	Gegenüberstellung der Messung der Luciferase-Aktivität sowie der <i>Real-Time</i> -RT-Messungen der mRNA der <i>Luciferase</i> und des endogenen <i>APOE</i> (1)	96
Abbildung 25:	Gegenüberstellung der Messung der Luciferase-Aktivität sowie der <i>Real-Time</i> -RT-Messungen der mRNA der <i>Luciferase</i> und des endogenen <i>APOE</i> (2)	97
Abbildung 26:	Validierung des Luciferase-Reporter-Gen-Assays (stabile U87-MG-Zelllinien) mit Dibutyryl-cAMP	99
Abbildung 27:	Validierung der <i>Real-Time</i> -RT-PCR-Methode mit Dibutyryl-cAMP	102
Abbildung 28:	Strukturformeln der zur weiteren Testung im Luciferase-Reporter-Gen-Assay ausgewählten Reinsubstanzen	105
Abbildung 29:	Ergebnisse des Screenings der ausgewählten Reinsubstanzen im Luciferase-Reporter-Gen-Assay	106
Abbildung 30:	Quantifizierung der <i>APOE</i> -mRNA: <i>Real-Time</i> -RT-PCR nach Inkubation mit den Reinsubstanzen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 28, LEYS 517 und Atorvastatin	107
Abbildung 31:	Luciferase-Reporter-Gen-Assay der ausgewählten TCM-Extrakte	108

Abbildung 32:	Quantifizierung der <i>APOE</i> -mRNA: <i>Real-Time</i> -RT-PCR nach Inkubation mit den TCM-Extrakten TCM 9 M und TCM 9 W	110
Abbildung 33:	Ergebnisse des Screenings der 13 ausgewählten Extrakte der Vanuatu-Wildsammlung	112
Abbildung 34:	Sequenzvergleich der ITS-Region von <i>T. pandacacui</i>	113
Abbildung 35:	Dünnschichtchromatogramme der Extrakte A 1, A 2 und A 3	116
Abbildung 36:	Dünnschichtchromatogramme der Alkaloidfraktion aus <i>T. pandacacui</i>	117
Abbildung 37:	Luciferase-Reportergen-Assay der Alkaloidfraktion des Dichlor-methanextrakts A 1	118
Abbildung 38:	Übersichtsschema der aktivitätsgeleiteten Fraktionierung des methanolischen Extrakts A 3	119
Abbildung 39:	Quantifizierung der <i>APOE</i> -mRNA: <i>Real-Time</i> -RT-PCR der aktiven Fraktionen aus <i>T. pandacacui</i> in 1321N1-Zellen	124
Abbildung 40:	Quantifizierung der <i>APOE</i> -mRNA: <i>Real-Time</i> -RT-PCR der aktiven Fraktionen aus <i>T. pandacacui</i> in U87-MG-Zellen	125
Abbildung 41:	Untersuchungen von aktiven Fraktionen aus <i>T. pandacacui</i> in einem modifizierten Reportergen-Assay	127
Abbildung A1:	Strukturformeln der getesteten Reinsubstanzen (I)	151
Abbildung A2:	Strukturformeln der getesteten Reinsubstanzen (II)	152
Abbildung A3:	Strukturformeln der getesteten Reinsubstanzen (III)	153
Abbildung A4:	Sequenzvergleich der ITS-Regionen von <i>T. pandacacui</i> I und II	154

Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge

Posterpräsentation

Boywitz K*, Schmidtke KU*, Bradacs G, Heilmann J und Winckler T (2009): Screening of Medicinal Plants from Vanuatu for neuroprotective properties. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft e.V. „Biotechnologisch erzeugte Wirkstoffe, Konzepte – Erfolge - Erwartungen“*, Jena.

(*contributed equally to this work)

Publikation

Boywitz K, Heilmann J, Gaube F, Werner U, Winckler T (2009): *APOE* modulatory activity of *Tabernaemontana pandacaqui*. (in Vorbereitung)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Februar 2005 und Februar 2009 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler angefertigt. Bei ihm möchte ich mich an erster Stelle ganz herzlich für die gute Betreuung, die Bereitschaft alle Fragen sofort und kompetent zu beantworten, zahlreiche Hilfestellungen sowie konstruktive Ideen zu praktischen und theoretischen Aspekten dieser Arbeit bedanken.

Meinem Co-Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg, (bis 2005: Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) möchte ich ebenso herzlich danken, insbesondere für die Übertragung dieses interessanten Themas, zahlreiche Hilfestellungen und die Bereitstellung der Mittel für meinen halbjährigen Forschungsaufenthalt am Lehrstuhl der Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg.

Frau Dr. Ulrike Werner möchte ich nicht nur für die Betreuung in der Anfangszeit dieser Arbeit danken, sondern auch für die Unterstützung und die vielen guten Ratschläge die sie mir zu Teil werden ließ.

Ein herzlicher Dank gilt meinem Bürokollegen Kai-Uwe Schmidtke, der mir auch in schweren Zeiten immer mit Rat und Tat zur Seite stand, und über die Jahre hinweg nicht nur ein Kollege war, sondern auch zu einem Freund wurde.

Dr. Friedemann Gaube bin ich für die durchgeführten *Real-Time*-RT-PCR-Messungen, die ITS-Sequenzanalyse und die große Unterstützung in der Schlussphase dieser Arbeit sehr dankbar.

Für die angenehme Zusammenarbeit in den zahlreichen Studentenpraktika sowie die schöne Zeit im Institut möchte ich den Kollegen Annika Bilzer, Dr. Sebastian Miethbauer, Jörg Lucas, Heike Dölz, Jana Schiefner, Steffen Rachow und Dr. Oliver Siol danken.

Den „alteingesessenen“ Kollegen Dr. Barbara Schubert, Heidemarie Graf, Sven Adler und Angela Reimann danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente, die Zusammenarbeit in den Studentenpraktika sowie für das herzliche Arbeitsklima im Institut.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen Dr. Susanne Vogel, Dr. Birgit Kraus, Dr. Guido Jürgenliemk, Sarah Geiger, Regina Schlegel, Magdalena Motyl und Matej Barbic aus der Pharmazeutischen Biologie der Universität Regensburg, die mich bereitwillig in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben und mir zahlreiche Hilfestellungen gaben, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Gabi Brunner möchte ich herzlich für die Durchführung der Strukturanalyse der isolierten Substanzen danken. Mein besonderer Dank gehört Susann Haase und Anne Freischmidt, mit denen ich neben der Arbeit auch viele schöne Abende in Regensburg verbracht habe.

Für die Durchsicht des Manuskriptes, zahlreiche Tipps und konstruktive Kritik danke ich Dr. Friedemann Gaube und Kai-Uwe Schmidtke.

Ein großer Dank auch an das „Dienstagstreffen“ für schöne Abende in geselliger Runde.

Für wunderschöne Abende, die Unterstützung in schweren Zeiten sowie erlebnisreiche Tage in Jena möchte ich meinen Freundinnen Tanja Vath, Esther Kowalski, Monique Nürnberger und Constanze Schaumberg-Brand von ganzem Herzen danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Patrick Boywitz, der mir jegliche Unterstützung zu Teil werden ließ. Insbesondere in der Schlussphase dieser Arbeit hat er sehr viel Verständnis für mich aufgebracht und mit seiner Liebe jeden Abend Ruhe und Zuversicht in mein Leben gebracht.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danken, die mir durch ihre Liebe und Unterstützung jederzeit Kraft für die Durchführung dieser Arbeit gegeben haben.

Lebenslauf

Name: Katrin Boywitz, geb. Bauer
Geburtsdatum: 14. März 1978
Geburtsort: München
Anschrift: Lutherstr. 31, 07743 Jena
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

09/1984 – 12/1984 Grundschule, Hausham
01/1985 – 07/1988 Grundschule, Niedernberg
09/1988 – 07/1995 Hermann-Staudinger-Gymnasium, Erlenbach/Main
09/1995 – 08/1996 John Bapst Memorial High School, Bangor, Maine, USA
09/1996 – 06/1998 Hermann-Staudinger-Gymnasium, Erlenbach/Main
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung und Studium

08/1998 – 04/1999 Beginn einer Ausbildung zur PKA in der Römer-Apotheke, Niedernberg
05/1999 – 10/2003 Studiengang Pharmazie an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
11/2003 – 10/2004 Praktisches Jahr in der Elisabeth-Apotheke, Würzburg und Apotheke des Kreiskrankenhauses Starnberg
12/2004 Approbation als Apothekerin

Beruflicher Werdegang

02/2005 – 03/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Doktorandin am Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena; Promotion unter der Betreuung von Prof. Dr. T. Winckler und Prof. Dr. J. Heilmann
Thema: „Screening nach neuroprotektiven Substanzen und Pflanzenextrakten – Untersuchung der Regulation von Apolipoprotein E“
04/2008 – 09/2008 Forschungsaufenthalt an der Universität Regensburg
seit 10/2008 Fortführung der Promotion am Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jena, 27. August 2009

Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät (Friedrich-Schiller-Universität Jena) unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe, wobei mir die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützend bei den aufgeführten Untersuchungen geholfen haben. Mir ist die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt. Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit noch an keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsleistung vorgelegt wurde. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Jena, 27. August 2009

Katrin Boywitz